



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δομικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός φυσικών μεταλλάξεων της απολιποπρωτεΐνης A-I. Μελέτη των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL).

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΓΚΟΛΦΙΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δομικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός φυσικών μεταλλάξεων της απολιποπρωτεΐνης A-I. Μελέτη των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL).

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΓΚΟΛΦΙΝΟΠΟΥΛΟΥ

A.M.: 001315

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Α΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Α΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αθανάσιος Γκιμήσης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Παναγιώτα Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ευαγγελία Εμμανουηλίδου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 20/02/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αν και τα χαμηλά επίπεδα της χοληστερόλης της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) θεωρούνται ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου (ΚΑΝ), πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα HDL-C δεν αποτελούν από μόνα τους αθηροπροστατευτικό δείκτη και πρέπει να συνοδεύονται από την ύπαρξη λειτουργικής HDL. Κύρια πρωτεΐνη της HDL είναι η απολιποπρωτεΐνη Α-I (αποΑ-I), η οποία κατέχει καίριο ρόλο στη βιογένεση, τη δομή και τις λειτουργίες της HDL. Οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL περιλαμβάνουν την ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος, την αντιφλεγμονώδη/ αντιοξειδωτική δράση, καθώς και τη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου.

Στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε εάν επηρεάζονται οι ιδιότητες της HDL ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ), η οποία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ΚΑΝ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η HDL ασθενών με ΑΣ παρουσιάζει διαταραγμένες αντιαθηρογόνες ιδιότητες. Η διαταραχή των ιδιοτήτων της HDL μπορεί να συνιστά μοριακή σύνδεση μεταξύ της ΑΣ και της ΚΑΝ.

Επιπλέον, στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η σχέση της δομής της αποΑ-I με τις λειτουργίες της αποΑ-I και της HDL. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε, με τη χρήση βιοφυσικών τεχνικών και *in vitro* ή κυτταρικών δοκιμασιών, η επίδραση στη δομή και τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποΑ-I/HDL τριών φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων της αποΑ-I, των L144R, A164S και L178P, οι οποίες έχουν σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση μιας νέας μετάλλαξης της αποΑ-I, της V19L, η οποία σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα HDL-C και μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ, στη δομή και τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποΑ-I/HDL. Συνολικά, τα ευρήματα έδειξαν ότι η εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων στην αποΑ-I μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, καθώς και στις αντιαθηρογόνες λειτουργίες της αποΑ-I και της HDL. Προτείνεται, ότι οι αλλαγές αυτές θα μπορούσαν να εξηγήσουν τη μεταβολή των επιπέδων HDL-C ή/και τη μεταβολή του κινδύνου ανάπτυξης ΚΑΝ, που έχουν σχετιστεί με τις μελετηθείσες μεταλλάξεις.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία, Οργανική Χημεία, Βιοφυσική, Βιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: απολιποπρωτεΐνη Α-I, δομή της απολιποπρωτεΐνης Α-I, HDL, αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL, καρδιαγγειακή νόσος

ABSTRACT

Although low levels of high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) are considered an independent risk factor for the development of cardiovascular disease (CVD), recent studies suggested that HDL-C levels alone cannot safely predict CVD risk and that HDL functionality may be more relevant for atheroprotection. Apolipoprotein A-I (apoA-I) constitutes the major protein component of HDL and plays a central role in HDL biogenesis, structure and function. HDL exerts a series of antiatherogenic properties, such as the ability to promote cholesterol efflux from artery wall macrophages, antioxidative ability, anti-inflammatory effects, as well as capacity for maintenance of endothelial integrity.

In the current PhD thesis it was evaluated whether HDL antiatherogenic properties are impaired in patients with ankylosing spondylitis (AS), a disease associated with increased CVD risk. The obtained findings show that HDL from patients with AS displays impaired antiatherogenic properties. Attenuation of HDL properties may constitute a molecular link between AS and CVD.

Additionally, in the current PhD thesis it was examined the structure-function relationship of human apoA-I/HDL. Specifically, it was investigated the effect of three naturally occurring point mutations in human apoA-I (L144R, A164S and L178P) that have been associated with increased CVD risk or/and low HDL-C levels, on structural integrity, by using biophysical techniques and on atheroprotective functions of apoA-I or HDL, by using *in vitro* and cell-based assays. In addition, it was examined the effect of a novel apoA-I mutation (V19L) that has been associated with increased HDL-C levels and decreased CVD risk, on structural integrity and on atheroprotective functions of apoA-I or HDL. Overall, the obtained data suggest that the insertion of point mutations in the molecule of apoA-I can cause changes to protein conformation and antiatherogenic properties of apoA-I and HDL. It is proposed that these changes may underlie the alterations in HDL-C levels or/and CVD risk, that have been observed in carriers of L144R, A164S, L178P and V19L apoA-I mutations.

SUBJECT AREA: Biochemistry, Organic Chemistry, Biophysics, Biology

KEYWORDS: apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-I structure, HDL, antiatherogenic properties of HDL, cardiovascular disease

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
1.1 Βιολογικός ρόλος και ταξινόμηση των λιποπρωτεϊνών	25
1.2 Η πορεία βιογένεσης, αναδιοργάνωσης και καταβολισμού της HDL	28
1.3 Υποπληθυσμοί της HDL	30
1.4 Απολιποπρωτεΐνη A-I	32
1.4.1 Το γονίδιο της αποA-I και η μεταγραφική του ρύθμιση	33
1.4.2 Βιοσύνθεση της αποA-I.....	34
1.4.3 Η δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I.....	35
1.4.4 Η δομή της λιπιδιωμένης αποA-I	40
1.5 Οι αλληλεπιδράσεις της αποA-I με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταβολισμού της HDL	46
1.5.1 Οι αλληλεπιδράσεις της αποA-I με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCA1.....	46
1.5.2 Οι αλληλεπιδράσεις της αποA-I με το ένζυμο LCAT	48
1.5.3 Οι αλληλεπιδράσεις της αποA-I με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1	51
1.5.4 Οι αλληλεπιδράσεις της αποA-I με τον υποδοχέα της HDL SR-BI.....	52
1.6 Φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις στην αποA-I	53
1.7 Αθηροσκλήρωση	54
1.7.1 Η δομή της αρτηρίας	54
1.7.2 Ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης	55
1.8 Οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL	58
1.8.1 Η πορεία ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης (RCT)	59
1.8.2 Οι προστατευτικές επιδράσεις της HDL στο ενδοθήλιο.....	60
1.8.3 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL	63
1.8.4 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL	64
1.8.5 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL	65
1.9 Δυσλειτουργική HDL.....	66
1.10 Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα	68
1.11 Θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν την αποA-I και την HDL	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	79
3.1 Απομόνωση HDL από τον ορό του αίματος	79

3.2 Απομόνωση LDL από τον ορό του αίματος	80
3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χοληστερόλης.....	81
3.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων.....	82
3.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης απολιποπρωτεΐνης A-I	83
3.6 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των HDL με τη δοκιμασία DCF	84
3.7 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου παραοξονάση 1 (PON1)..	86
3.8 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση (MPO)	87
3.9 Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων	88
3.9.1 Παραγωγή επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> XL1-Blue και BL21-Gold(DE3).....	89
3.9.2 Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> XL1-Blue και BL21-Gold(DE3).....	91
3.10 Κατασκευή του ανασυνδυσμένου πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pET32-αποA-I3C	92
3.10.1 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού	92
3.10.2 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	93
3.10.3 Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA με συμπληρωματικά άκρα (ligation reaction)	95
3.11 <i>In vitro</i> τοποκατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξιγένεση.....	96
3.12 Έκφραση της ανασυνδυσμένης ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης A-I, αποA-I, σε βακτηριακά κύτταρα	99
3.12.1 Βακτηριακά επιδεκτικά κύτταρα <i>E.coli</i> BL21-Gold(DE3).....	99
3.12.2 Σύστημα βακτηριακής έκφρασης πρωτεϊνών pET	100
3.12.3 Έκφραση της ανασυνδυσμένης ανθρώπινης αποA-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της σε βακτηριακά κύτταρα <i>E.coli</i> BL21-Gold(DE3)	101
3.13 Απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυσμένης αποA-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της	103
3.13.1 Απομόνωση των ανασυνδυσμένων, χιμαιρικών αποA-I από τα βακτηριακά κύτταρα έκφρασης <i>E.coli</i> BL21-Gold(DE3)	103

3.13.2 Καθαρισμός των ανασυνδυασμένων, χιμαιρικών πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου	105
3.13.3 Αντίδραση πέψης της ετικέτας Trx-His από τις χιμαιρικές πρωτεΐνες με τη χρήση της πρωτεάσης His-3C.....	107
3.13.4 Απομόνωση της τμημένης αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου.....	108
3.14 Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεάσης 3C-His ...	109
3.15 Παρασκευή και ανάλυση δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL	111
3.15.1 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL reconstituted HDL, rHDL).....	111
3.15.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης φωσφολιπιδίων	113
3.16 Προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου LCAT.....	114
3.17 Μέτρηση ραδιενέργειας μέσω σπινθηρισμού υγρών	117
3.18 Βιοφυσική ανάλυση της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της	118
3.18.1 Προετοιμασία των δειγμάτων της αποΑ-I.....	118
3.18.2 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας της αποΑ-I με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	120
3.18.3 Παρακολούθηση της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-I με Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού	123
3.18.4 Παρακολούθηση της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-I με Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	125
3.18.5 Προσδιορισμός της υδροφοβικότητας της αποΑ-I με χρήση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS	127
3.19 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τις πρωτεΐνες αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P].....	128
3.20 Καλλιέργειες κυττάρων	130
3.20.1 Κυτταρικές σειρές J774 και HEK293.....	130
3.20.1.1 Έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων J774 και HEK293	131
3.20.1.2 Διατήρηση-ανάπτυξη καλλιέργειών κυττάρων J774 και HEK293	131
3.20.1.3 Δημιουργία αποθεματικής καλλιέργειας κατεψυγμένων κυττάρων J774 και HEK293	132

3.20.2 Κυτταρική σειρά EA.hy926 και πρωτογενής καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων HCAEC	133
3.20.2.1 Έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων EA.hy926 και HCAEC...	134
3.20.2.2 Διατήρηση-ανάπτυξη καλλιέργειών κυττάρων EA.hy926 και HCAEC	134
3.20.2.3 Δημιουργία αποθεματικής καλλιέργειας κατεψυγμένων κυττάρων EA.hy926	135
3.21 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης από μακροφάγα J774 μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1.....	135
3.22 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης και 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293 μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή του υποδοχέα της HDL SR-BI.....	138
3.22.1 Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικού.....	138
3.22.2 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 που έχουν επιμολυνθεί με τον φορέα έκφρασης pcDNA 3.1-SR-BI ή pcDNA 3.1-ABCG1	139
3.22.3 Δοκιμασία εκροής 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293 που έχουν επιμολυνθεί με τον φορέα έκφρασης pcDNA 3.1-ABCG1	142
3.23 Επίδραση της αποA-I/HDL στη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων	142
3.23.1 Δοκιμασία προσομοίωσης επούλωσης πληγών (wound healing assay) σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 και HCAEC	142
3.23.2 Μελέτη της επίδρασης δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL στη μοριακή οδό σηματοδότησης της μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926.....	145
3.23.2.1 Επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 με δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL	145
3.23.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926	146
3.23.2.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά western	148
3.24 Προσδιορισμός των επιπέδων της μηλονικής διαλδεΰδης (malondialdehyde, MDA)	150
3.25 Μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε κύτταρα EA.hy926	152
3.26 Πληθυσμός ασθενών μελέτης και στατιστική ανάλυση δεδομένων	153

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	155
4.1 Χαρακτηρισμός των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα (ΑΣ)	155
4.1.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων μελέτης.....	156
4.1.2 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα.....	158
4.1.3 Επαγόμενη εκροή κυτταρικής χοληστερόλης μέσω της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα.....	159
4.1.4 Προσδιορισμός της δραστικότητας των ενζύμων PON1 και MPO της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα.....	160
4.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού της ανασυνδυσμένης αποΑ-I σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων	162
4.2.1 Κατασκευή του ανασυνδυσμένου πλασμιδιακού φορέα pET32a-αποΑ-I3C	163
4.2.2 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της αποΑ-I άγριου τύπου σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων	164
4.2.3 Βιοφυσική ανάλυση της παραγόμενης μέσω βακτηριακών κυττάρων ανασυνδυσμένης αποΑ-I	166
4.3 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων της απολιποπρωτεΐνης Α-I που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C	170
4.3.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός των αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων.....	171
4.3.2 Βιοφυσική ανάλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P].....	172
4.3.2.1 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας των ελεύθερων λιπιδίων αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	173
4.3.2.2 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των ελεύθερων λιπιδίων αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου.....	175
4.3.2.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου.....	178

4.3.2.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] και αποΑ-I άγριου τύπου στον διαλύτη	181
4.3.2.5 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη διαμορφωτική σταθερότητα της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamics simulations)	182
4.3.2.6 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής και της θερμοδυναμικής σταθερότητας των αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] ως συστατικών των δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL	186
4.3.3 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P].....	188
4.3.3.1 Μελέτη της ικανότητας των ελεύθερων λιπιδίων αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1.....	188
4.3.3.2 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στην ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να επάγει εκροή χοληστερόλης και 7-κετοχοληστερόλης μέσω του υποδοχέα της HDL SR-BI ή μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1	190
4.3.3.3 Μελέτη της επίδρασης των σημειακών μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στην ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να επάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων.....	195
4.3.3.4 Διερεύνηση της επίδρασης δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] στη μοριακή οδό σηματοδότησης της μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926.....	200
4.3.3.5 Διερεύνηση της επίδρασης του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 παρουσία δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S].....	204
4.3.3.6 Προσδιορισμός των επιπέδων μηλονικής διαλδεΰδης στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]	209
4.3.3.7 Προσδιορισμός των επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία δισκοειδών σωματιδίων	

ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I [A164S]	211
4.4 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας της φυσικά απαντώμενης σημειακής μετάλλαξης V19L της αποΑ-I που σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου και με αυξημένα επίπεδα HDL-C	213
4.4.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης αποΑ-I[V19L] σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων	214
4.4.2 Βιοφυσική ανάλυση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης αποΑ-I[V19L] σε ελεύθερη λιπιδίων και λιπιδιωμένη μορφή	215
4.4.2.1 Μελέτη της ελικότητας της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	216
4.4.2.2 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης της της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου	217
4.4.2.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου	219
4.4.2.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών της αποΑ-I[V19L] και αποΑ-I άγριου τύπου στο διαλύτη	221
4.4.2.5 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής και της θερμοδυναμικής σταθερότητας της αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L] ως συστατικών των δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL	222
4.4.3 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, αποΑ-I[V19L]	224
4.4.3.1 Μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης V19L στη βιογένεση της HDL	224
4.4.3.2 Μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης V19L στην ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορά λιπιδίων ABCG1 ή μέσω του υποδοχέα της HDL, SR-BI	226
4.4.3.3 Μελέτη της επίδρασης της σημειακής μετάλλαξης V19L στην ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να επάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων	229
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	231
5.1 Χαρακτηρισμός των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα	231

5.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης αποΑ-I σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων.....	234
5.3 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων της αποΑ-I που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C	235
5.4 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας της φυσικά απαντώμενης σημειακής μετάλλαξης V19L της αποΑ-I που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HDL-C και με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου.....	240
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	247
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	248
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	253
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	254

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 4.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα των HDL ασθενών με ΑΣ και των ατόμων αναφοράς.....	158
Σχήμα 4.2. Επαγόμενη εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία 2% v/v HDL ασθενών με ΑΣ και ατόμων αναφοράς.....	159
Σχήμα 4.3. Δραστικότητα των ενζύμων PON1 και MPO σε ασθενείς με ΑΣ και άτομα αναφοράς	161
Σχήμα 4.4. Κατασκευή του φορέα pET32a-αποA-I3C και ανάλυσή του σε πηκτή αγαρόζης.....	164
Σχήμα 4.5. Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης αποA-I.	165
Σχήμα 4.6. Ανάλυση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων ανασυνδυασμένης αποA-I που έχουν παραχθεί μέσω διαφορετικών συστημάτων έκφρασης	166
Σχήμα 4.7. Φυσικοχημικές ιδιότητες των αποA-I _{E. coli} και αποA-I _{adenovirus}	169
Σχήμα 4.8. Ανάλυση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων αποA-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I μετά τη διαδικασία αποδιάταξης-επαναδιάταξης.....	172
Σχήμα 4.9. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες της αποA-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της, αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P]	174
Σχήμα 4.10. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την εκατοστιαία ελικότητα των αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] σε αντιπαραβολή με την ελικότητα της αποA-I άγριου τύπου.....	175
Σχήμα 4.11. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων αποA-I σε αντιπαραβολή με το προφίλ της αποA-I άγριου τύπου	176
Σχήμα 4.12. Ραβδογράμματα που απεικονίζουν τις μεταβολές των θερμοδυναμικών παραμέτρων που παρουσίασαν οι αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] κατά τη θερμική τους αποδιάταξη, σε αντιπαραβολή με την αποA-I άγριου τύπου	177
Σχήμα 4.13. Προφίλ χημικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων αποA-I σε αντιπαραβολή με το προφίλ της αποA-I άγριου τύπου	179
Σχήμα 4.14. Ραβδογράμματα που απεικονίζουν τις μεταβολές των παραμέτρων που παρουσίασαν οι αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] κατά τη χημική τους αποδιάταξη, σε αντιπαραβολή με την αποA-I άγριου τύπου.	180
Σχήμα 4.15. Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία της αποA-I άγριου τύπου και των αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P].....	181

Σχήμα 4.16. Λόγοι του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS παρουσία της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της προς τον εκπεμπόμενο φθορισμό του ANS απουσία πρωτεΐνης.....	182
Σχήμα 4.17. RMSDs των ατόμων του πεπτιδικού σκελετού των πρωτεϊνών που εξήχθησαν από τις προσομοιώσεις (200 ns) των αποΑ-I[Δ(1-43)] και αποΑ-I[Δ(185-243)] και των αντίστοιχων μεταλλαγμένων μορφών τους	184
Σχήμα 4.18. Σχηματική και γραφική αναπαράσταση των τιμών RMSF που εξήχθησαν από τις προσομοιώσεις της αποΑ-I[Δ(185-243)] άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της	185
Σχήμα 4.19. Γραφική αναπαράσταση των τιμών RMSF ανά κατάλοιπο των ατόμων του πεπτιδικού σκελετού που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της αποΑ-I[Δ(1-43)] άγριου τύπου (συμβολίζονται με μπάρες) και των μεταλλαγμένων μορφών της (έγχρωμες συμπαγείς γραμμές).....	185
Σχήμα 4.20. Βιοφυσική ανάλυση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S], αποΑ-I[L178P]	187
Σχήμα 4.21. ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία 1 μM αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] ή αποΑ-I[L178P].....	189
Σχήμα 4.22. SR-BI-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν τις αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P].....	192
Σχήμα 4.23. ABCG1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν τις αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P].....	193
Σχήμα 4.24. ABCG1-εξαρτώμενη εκροή 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S].....	194
Σχήμα 4.25. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες αποΑ-I, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] ή αποΑ-I[L178P], στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926.....	197
Σχήμα 4.26. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] στη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων στεφανιαίας αρτηρίας, HCAEC	199
Σχήμα 4.27. Επίδραση των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[A164S] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926	201

Σχήμα 4.28. Επίδραση των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[A164S] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της HDL SR-BI σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926	203
Σχήμα 4.29. Επίδραση της αναστολής του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]....	205
Σχήμα 4.30. Επίδραση της αναστολής του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt από ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία της αποΑ-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια	207
Σχήμα 4.31. Επίδραση των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[A164S] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα LOX-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.....	209
Σχήμα 4.32. Προσδιορισμός των επιπέδων της MDA σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S].....	210
Σχήμα 4.33. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[164S] στον σχηματισμό ROS από ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926	212
Σχήμα 4.34. Ανάλυση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L] μετά τη διαδικασία αποδιάταξης-επαναδιάταξης	215
Σχήμα 4.35. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες της αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L]	216
Σχήμα 4.36. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με το προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου	218
Σχήμα 4.37. Προφίλ χημικής αποδιάταξης της αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με το προφίλ αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου	219
Σχήμα 4.38. Επίδραση της μετάλλαξης V19L στο υδρόφοβο προφίλ της αποΑ-I	221
Σχήμα 4.39. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας (4-20% v/v) rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L]	222
Σχήμα 4.40. Βιοφυσική ανάλυση των rHDL αωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L].	223

Σχήμα 4.41. ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία 1 μM αποΑ-I άγριου τύπου ή αποΑ-I[V19L].....	225
Σχήμα 4.42. Καταλυτική δραστικότητα της LCAT ($V_{\text{maxapp}}/K_{\text{Mapp}}$) παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L].....	226
Σχήμα 4.43. ABCG1 και SR-BI-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L].....	228
Σχήμα 4.44. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποΑ-I, αποΑ-I[V19L] στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926	230

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου σφαιρικής διαμόρφωσης	25
Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας βιογένεσης και αναδιοργάνωσης της HDL.....	29
Εικόνα 1.3: Ετερογένεια της HDL.....	31
Εικόνα 1.4: Ανάλυση των υποπληθυσμών της HDL που περιέχουν αποΑ-I ανθρώπινου πλάσματος σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων	32
Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση της συστάδας των γονιδίων των αποΑ-I/αποC-III/αποΑ-IV.....	34
Εικόνα 1.6. Η κρυσταλλική δομή, σε ανάλυση 4 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-I στο N-τελικό της άκρο, αποΑ-I[Δ(1-43)].....	36
Εικόνα 1.7. Η κρυσταλλική δομή, σε ανάλυση 2.2 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-I στο C-τελικό της άκρο, αποΑ-I[Δ(185-243)]...	37
Εικόνα 1.8. Χαρακτηριστικά μοντέλα της ελεύθερης λιπιδίων πλήρους μήκους αποΑ-I.....	38
Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου «συναινετικού» μοντέλου της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I.....	39
Εικόνα 1.10. Το μοντέλο «διπλής ζώνης» (“double belt”) της δισκοειδούς HDL.	41
Εικόνα 1.11. Σύγκριση των αλληλεπιδράσεων των μορίων της αποΑ-I σε ένα δισκοειδές σωματίδιο «διπλής ζώνης» (“double belt”) και σε ένα σφαιρικό σωματίδιο «τριφύλλι» (“trefoil”).....	42
Εικόνα 1.12. Το μοντέλο «τριφύλλι» (“trefoil”) των σφαιρικών HDL σωματιδίων του ανθρώπινου πλάσματος.....	43

Εικόνα 1.13. Αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-I πλήρους μήκους στο μοντέλο «διπλής ζώνης», βασισμένο στην κρυσταλλική δομή της αποΑ-I[Δ(185-243)].....	44
Εικόνα 1.14. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-I πλήρους μήκους σε δισκοειδή και σφαιρικά HDL σωματίδια, μετά τη δράση της LCAT, καθώς αυτά μεγαλώνουν σε μέγεθος με την πρόσληψη χοληστερόλης.	45
Εικόνα 1.15. Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1	47
Εικόνα 1.16. Η κεντρική περιοχή της LCAT	49
Εικόνα 1.17. Ο ρόλος της LCAT στο μεταβολισμό της HDL.....	50
Εικόνα 1.18. Η δομή μιας μεγάλης φυσιολογικής αρτηρίας.....	55
Εικόνα 1.19. Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη γεγονότων που προάγουν το σχηματισμό αθηροσκληρωτικών πλακών.....	57
Εικόνα 1.20. Οι πλειοτροπικές αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL.....	59
Εικόνα 1.21. Επαγωγή μηχανισμών επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου μέσω της πρόσδεσης της HDL στον υποδοχέα της SR-BI	62
Εικόνα 1.22. Σχηματική αναπαράσταση της διαταραχής των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL.....	67
Εικόνα 3.1. Αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη δοκιμασία DCF.....	85
Εικόνα 3.2. Αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τον προσδιορισμό δραστηριότητας της PON1.....	86
Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του επαγωγέα IPTG στο βακτηριακό σύστημα έκφρασης pET.....	101
Εικόνα 3.4. Διάγραμμα του πεπτιδικού δεσμού που απεικονίζει τον προσανατολισμό των δίπολων μετάπτωσης (ως βέλη) για τις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ και $\pi \rightarrow \pi^*$	121
Εικόνα 3.5: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού πολυ-L-λυσίνης σε διαμορφώσεις 100% α-έλικας (καμπύλη 1), β-φύλλου (καμπύλη 2) και τυχαίου σπειράματος (καμπύλη 3).	122
Εικόνα 4.1. Αναπαραστάσεις των κρυσταλλικών δομών της αποΑ-I, που αναδεικνύουν τις θέσεις που εντοπίζονται τα μεταλλαγμένα αμινοξικά κατάλοιπα L144, A164 και L178.....	173
Εικόνα 4.2. Αναπαραστάση του «συνεναιτικού» μοντέλου της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων ανθρώπινης αποΑ-I, που αναδεικνύει τη θέση της μετάλλαξης V19	215

Εικόνα 5.1. Αναπαραστάση του μοντέλου της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων ανθρώπινης αποΑ-I, που αναδεικνύει τη θέση που εντοπίζονται τα κατάλοιπα της βαλίνης, της λευκίνης και της λυσίνης.....	242
--	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Ιδιότητες και σύσταση των πέντε τάξεων λιποπρωτεϊνών του πλάσματος.....	26
Πίνακας 3.1. Ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινήτων.....	98
Πίνακας 3.2. Πρόγραμμα σε μηχανήμα PCR για την εισαγωγή των προαναφερθέντων σημειακών μεταλλάξεων στο μόριο της αποΑ-I.....	99
Πίνακας 3.3. Τα χαρακτηριστικά και η αραίωση των πρωτευνόντων αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αποτύπωση western.....	149
Πίνακας 4.1. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΑΣ και των ατόμων αναφοράς.....	157
Πίνακας 4.2. Εκατοστιαία ποσοστά α-έλικας των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L], τα οποία προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.	217
Πίνακας 4.3. Παράμετροι που προσδιορίστηκαν από τις καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L].	218
Πίνακας 4.4. Θερμοδυναμικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα της χημικής αποδιάταξης των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L].....	220

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο 2014-2019 στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «Δημόκριτος», σε συνεργασία με τον Τομέα Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Α΄ του Ε.ΚΕ.Φ.Ε.«Δημόκριτος», Δρ. Αγγελικής Χρόνη, την οποία και ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, την ευχαριστώ για τη συμβολή της στη συγγραφή και δημοσίευση των πειραματικών αποτελεσμάτων της διατριβής αυτής, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε αξιόλογα επιστημονικά συνέδρια. Παράλληλα, η διατριβή αυτή εκπόνηθηκε υπό την επίβλεψη του Δρ. Θωμά Μαυρομούστακου, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί με δέχτηκε ως διδακτορική φοιτήριά του, καθώς και για τη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ για τη συνεργασία και τη συμμετοχή της στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή την Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών Δρ. Ντία Γαλανοπούλου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, διότι με τις παρατηρήσεις τους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Α΄ του Ε.ΚΕ.Φ.Ε.«Δημόκριτος» Δρ. Ευστράτιο Στρατίκο, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. T. Kelicci, συνεργάτη του Δρ. Θωμά Μαυρομούστακου, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη διεξαγωγή των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Δ. Καρδάση, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηρακλείου Κρήτης και τη Δρ. Δ. Σανούδου, Επίκουρη Καθηγήτρια της Δ΄ Παθολογικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ και Ερευνήτρια του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, για την παροχή πολύτιμων συμβουλών, καθώς και την

παροχή υλικών, απαραίτητων για τη διαικπεραίωση μέρους της πειραματικής διαδικασίας.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εργαστηριακή μου «οικογένεια», τους ανθρώπους με τους οποίους μοιράστηκα τις ανησυχίες μου, τις καθημερινές στιγμές μου και που χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να ολοκληρώσω αυτήν την εργασία. Ονομαστικά ευχαριστώ τον Δρ. Ιωάννη Δάφνη, τον Δρ. Γεώργιο Δανιήλ, τη Δρ. Λέττα Άργυρη και τη Δρ. Φαίη Σούκου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο, φίλη και συνοδοιπόρο Δρ. Αρχοντία Καμινάρη, για τις στιγμές και τις ανησυχίες που μοιραστήκαμε κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών.

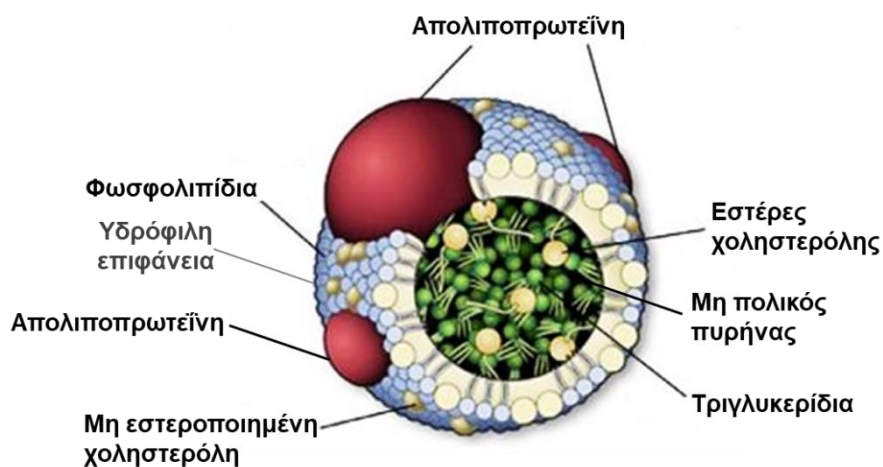
Κλείνοντας ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για την κατανόηση και τη διαρκή ηθική συμπαράσταση και υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια αυτής μου της προσπάθειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογικός ρόλος και ταξινόμηση των λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά, υδατοδιαλυτά συμπλέγματα λιπιδίων και πρωτεϊνών, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά στη συστηματική κυκλοφορία και τη διανομή στους διάφορους ιστούς των μη διαλυτών σε υδατικά διαλύματα λιπιδίων, όπως της ελεύθερης χοληστερόλης (free cholesterol, FC), των εστέρων χοληστερόλης (cholesteryl esters, CE), των φωσφολιπιδίων (phospholipids, PL) και των τριγλυκεριδίων (triglycerides, TG)^[1]. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος είναι σφαιρικά σωματίδια και σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις δισκοειδή σωματίδια. Τα σφαιρικά σωματίδια αποτελούνται από έναν ουδέτερο, μη πολικό πυρήνα λιπιδίων και μια υδρόφιλη επιφάνεια, η οποία περιβάλλει τον πυρήνα. Ο πυρήνας περιέχει κυρίως εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια, ενώ η υδρόφιλη επιφάνεια απαρτίζεται από περισσότερο πολικά μόρια, όπως φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και πρωτεΐνες (Εικόνα 1.1). Τα δισκοειδή σωματίδια αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες και πολικά λιπίδια, όπως φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, σε μορφή διπλοστιβάδας (bilayer). Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν λιπίδια και σχηματίζουν τις λιποπρωτεΐνες ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες και σταθεροποιούν τη μυκηλιακή δομή αυτών των σωματιδίων^[1,2].



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου σφαιρικής διαμόρφωσης (τροποποιημένη εικόνα από [2]).

Η σύσταση και ο λόγος των πρωτεϊνών προς τα λιπίδια καθορίζει το μέγεθος και την πυκνότητα των λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται σε πέντε κύριες τάξεις με βάση την επίπλευσή τους μετά από υπερφυγοκέντρωση, η οποία καθορίζεται από την πυκνότητά τους. Κατά αυξανόμενη πυκνότητα ταξινομούνται σε χυλομικρά (chylomicrons, CM), πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (very low density lipoprotein, VLDL), ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (intermediate density lipoprotein, IDL), χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (low density lipoprotein, LDL) και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (high density lipoprotein, HDL)^[3]. Οι λιποπρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται επίσης βάσει του μεγέθους των σωματιδίων, της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας ή της χρωματογραφίας συγγένειας^[4]. Στον πίνακα 1.1 παρατίθενται οι πηγές προέλευσης, τα βασικά χαρακτηριστικά, καθώς και το λιπιδικό και πρωτεϊνικό περιεχόμενο των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων.

Πίνακας 1.1. Ιδιότητες και σύσταση των πέντε τάξεων λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. (τροποποιημένος πίνακας από [3]).

Ιδιότητες και Συστατικά	Χυλομικρά	VLDL	IDL	LDL	HDL
Πηγή	έντερο	ήπαρ	VLDL/HDL	VLDL	ήπαρ (κυρίως), έντερο
Μέγεθος (Å)	750-12.000	300-800	250-350	180-300	50-120
Πυκνότητα (g/mL)	<0,94	0,94-1,006	1,006-1.019	1,019-1,063	1,063-1,21
Μοριακή Μάζα (kDa)	~400.000	10-80.000	5-10.000	2.300	175-360
Τριγλυκερίδια (%)	80-95	45-65	22	4-8	2-7
Φωσφολιπίδια (%)	3-6	15-20	21	18-24	26-32
Ελεύθερη Χοληστερόλη (%)	1-3	4-8	8	6-8	3-5
Εστεροποιημένη Χοληστερόλη (%)	2-4	16-22	30	45-50	15-20
Πρωτεΐνες (%)	1-2	6-10	15-20	18-22	45-55
Απολιποπρωτεΐνες	B-48, C1, CIII, E, A-I, A-IV	B-100, E, C1, CII, CIII	B-100, E, CIII	B-100, E	A-I, A-II, E, A-IV

Οι λιποπρωτεΐνες συντίθενται και καταβολίζονται μέσω τριών ξεχωριστών, αλλά αλληλεπιδρυσών πορειών, την πορεία των χυλομικρών, την πορεία των VLDL/IDL/LDL και την πορεία της HDL. Μια πληθώρα πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των απολιποπρωτεϊνών, ενζύμων, πρωτεϊνών

ανταλλαγής λιπιδίων, υποδοχέων λιποπρωτεϊνών και μεταφορέων λιπιδίων συμμετέχουν σε αυτές τις πορείες και συμβάλλουν στην ομοίωση των λιπιδίων^[5-7]. Περιληπτικά, ο κύριος ρόλος της πορείας των χυλομικρών είναι η μεταφορά των λιπιδίων που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής από το έντερο προς τους περιφερικούς ιστούς. Τα χυλομικρά συντίθενται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου με το πακετάρισμα των λιπιδίων, κυρίως τριγλυκεριδίων, με την απολιποπρωτεΐνη B-48 (αποB-48) και κατόπιν εκκρίνονται και μεταφέρονται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στους περιφερικούς ιστούς. Στους μυς και τον λιπώδη ιστό η λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase, LPL) καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών προς γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία απορροφώνται από τους ιστούς^[8]. Τα υπολείμματα των χυλομικρών που είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης και φέρουν στην επιφάνειά τους την απολιποπρωτεΐνη E (αποE) απομακρύνονται γρήγορα από την κυκλοφορία μέσω του ήπατος, από τον υποδοχέα της LDL (LDL receptor, LDLr) ή άλλους υποδοχείς που αναγνωρίζουν την αποE^[9]. Στο ήπαρ τα λιπίδια πακετάρονται με την αποB-100 και εκκρίνονται ως λιποπρωτεΐνες VLDL. Κατόπιν υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων της VLDL από την LPL και την ηπατική λιπάση (hepatic lipase, HL), σχηματίζονται αρχικώς οι λιποπρωτεΐνες IDL και τελικώς οι λιποπρωτεΐνες LDL. Οι LDL προσλαμβάνονται και καταβολίζονται από το ήπαρ, μέσω της πρόσδεσής τους στον υποδοχέα τους LDLr, καθώς και μέσω άλλων διαδικασιών. Ο ρόλος της πορείας των VLDL/IDL/LDL είναι η μεταφορά τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης από το ήπαρ προς τους περιφερικούς ιστούς, όπου αυτή απαιτείται^[10]. Εν αντιθέσει, η HDL βιοσυντίθεται εξωκυτταρικά, μετά την έκκριση της ελεύθερης λιπιδίων απολιποπρωτεΐνης A-I (αποA-I), κυρίως από το ήπαρ^[11]. Ο σχηματισμός των ώριμων HDL σωματιδίων είναι πολύπλοκη διαδικασία και περιλαμβάνει αρκετά στάδια^[9]. Ο κύριος φυσιολογικός ρόλος της HDL είναι να διευκολύνει τη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς προς το ήπαρ, μία διαδικασία που είναι γνωστή ως ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (reverse cholesterol transport, RCT)^[12].

Αρκετές ανθρώπινες ασθένειες έχουν συσχετιστεί με διαταραχές των τριών πορειών μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών^[3]. Επιπλέον, πολυάριθμες, επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες καταδεικνύουν ότι υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της HDL-χοληστερόλης (HDL-cholesterol, HDL-C) και του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου^[13] (cardiovascular disease, CVD).

Στα πλαίσια αυτής της διατριβής θα επικεντρωθούμε στον μεταβολισμό και τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL, καθώς και στον ρόλο που διαδραματίζει η αποΑ-I, το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL, στις διαδικασίες αυτές.

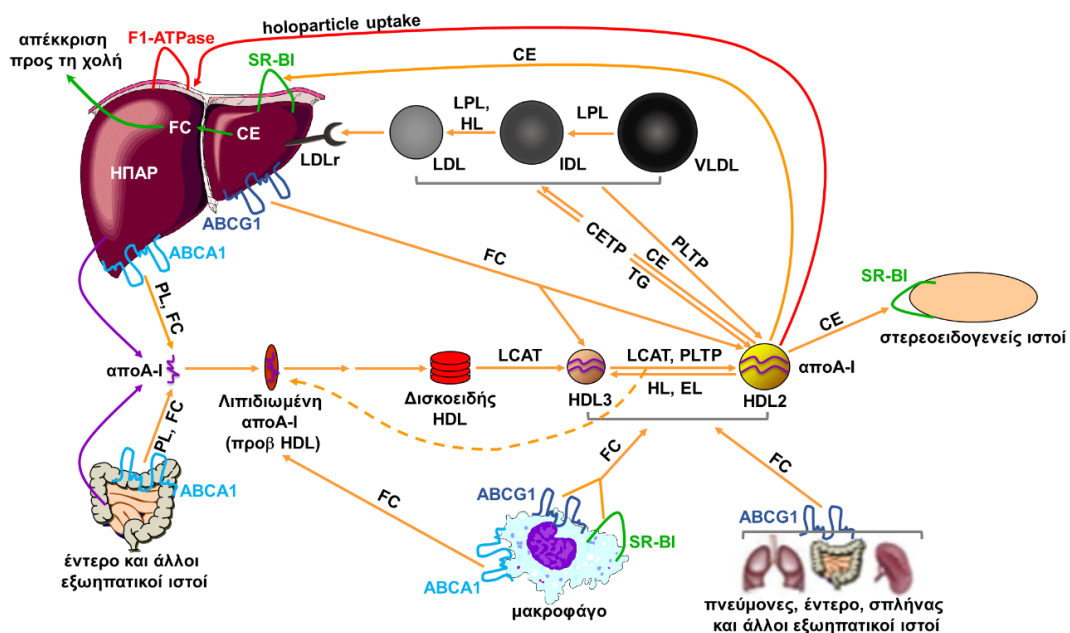
1.2 Η πορεία βιογένεσης, αναδιοργάνωσης και καταβολισμού της HDL

Η πορεία μεταβολισμού της HDL αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει αρκετά στάδια και απαιτεί τη συμμετοχή πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών του πλάσματος^[14]. Κατά το πρώτο βήμα της πορείας βιογένεσης της HDL, η αποΑ-I, η οποία έχει εκκριθεί ελεύθερη λιπιδίων κυρίως από το ήπαρ και σε λιγότερο βαθμό από το έντερο^[11], αλληλεπιδρά με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1, μεταφορέας με κασέτα δέσμευσης ATP A1) και προσλαμβάνει φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη^[14]. Στη συνέχεια, μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων βημάτων, τα οποία δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, η αποΑ-I λιπιδιώνεται περαιτέρω και μετατρέπεται σταδιακά σε πρόδρομα, δισκοειδή HDL σωματίδια, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με μη εστεροποιημένη χοληστερόλη. Η ωρίμανση της πρόδρομης HDL επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης (lecithin: cholesterol acyl transferase, LCAT), το οποίο ενεργοποιείται από τη λιπιδιωμένη αποΑ-I και καταλύει την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης στην επιφάνεια της HDL^[14]. Η εστεροποιημένη χοληστερόλη πακετάρεται εντός του μη πολικού πυρήνα της HDL, οδηγώντας στον σχηματισμό των σφαιρικών HDL σωματιδίων (Εικόνα 1.2).

Η HDL μετά τον σχηματισμό της μπορεί να αναδιοργανωθεί, μέσω των αλληλεπιδράσεών της με διάφορους κυτταρικούς υποδοχείς και πρωτεΐνες του πλάσματος^[14]. Η HDL αλληλεπιδρά με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1), προάγοντας την εκροή κυτταρικής χοληστερόλης από τα μακροφάγα και τους περιφερικούς ιστούς προς την HDL^[15,16], καθώς και με την πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων (phospholipid transfer protein, PLTP), οδηγώντας στη μεταφορά φωσφολιπιδίων από τις VLDL/IDL προς την HDL^[17,18]. Επίσης, η δράση της PLTP, αλλά και της LCAT συμβάλλουν στον σχηματισμό των ώριμων, σφαιρικών HDL σωματιδίων, τα οποία είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης^[14,19]. Παράλληλα, η HDL προσδένεται στον υποδοχέα της SR-BI (scavenger receptor class B type I, υποδοχέας εκκαθαριστής τάξη B τύπος I), ο

οποίος επάγει την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από την HDL προς τα κύτταρα του ήπατος, οδηγώντας στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από την κυκλοφορία μέσω της χολής, καθώς και την αμφίδρομη εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα προς την HDL^[7,20]. Περαιτέρω, η HDL μπορεί να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (cholesteryl ester transfer protein, CETP) και οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν στη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL προς τις VLDL/IDL/LDL, προς ανταλλαγή τριγλυκεριδίων^[21]. Τελικώς, η ηπατική (HL) και η ενδοθηλιακή λιπάση (endothelial lipase, EL) υδρολύουν κυρίως τα φωσφολιπίδια και σε λιγότερο βαθμό τα τριγλυκερίδια της HDL και η δράση τους οδηγεί στον σχηματισμό της ελάχιστα λιπιδιωμένης apoA-I^[22,23]. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), η οποία υδρολύει τα τριγλυκερίδια των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε αυτά, επηρεάζει την αναδιοργάνωση της HDL^[24] (Εικόνα 1.2).

Η απομάκρυνση της HDL του πλάσματος από την κυκλοφορία λαμβάνει χώρα μέσω της δράσης κυτταρικών υποδοχέων. Στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, η apoA-I δεσμεύεται στην υπομονάδα F1 της συνθάσης της ATP, η οποία επάγει την ενδοκύτωση ολόκληρου του σωματιδίου της HDL (holoparticle uptake)^[25]. Επιπρόσθετα, η ελεύθερη λιπιδίων και η ελάχιστα λιπιδιωμένη apoA-I απομακρύνονται μέσω των υποδοχέων μεγαλίνης/κουμπουλίνης, οι οποίοι εντοπίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών^[14].



Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας βιογένεσης και αναδιοργάνωσης της HDL (τροποποιημένη εικόνα από [26]).

Έχει δειχθεί ότι μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες μπορούν να επηρεάσουν τη βιογένεση, την ωρίμανση, καθώς και τις ιδιότητες της HDL^[26,27]. Η δομική ακεραιότητα της αποΑ-I, αλλά και οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τις πρωτεΐνες ABCA1, LCAT, ABCG1 και SR-BI είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη βιογένεση και τις ιδιότητες της HDL και θα αναλυθούν λεπτομερέστερα παρακάτω.

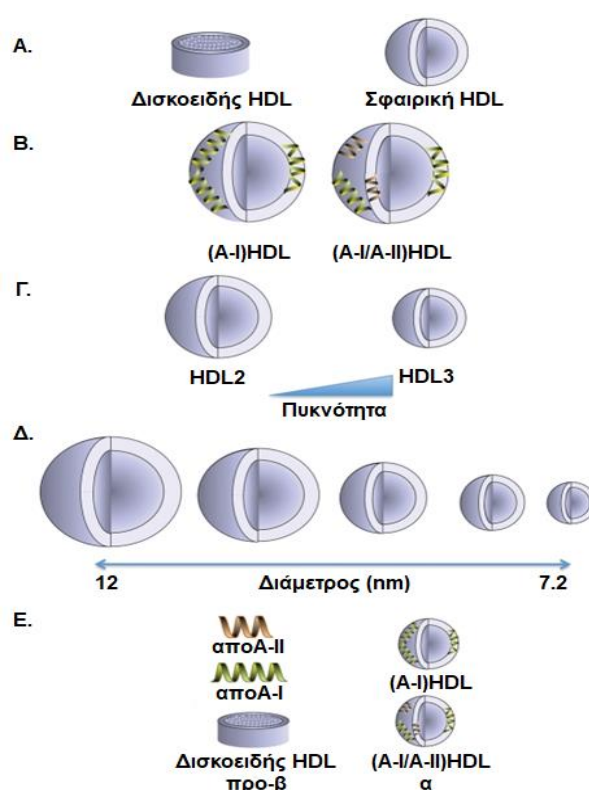
1.3 Υποπληθυσμοί της HDL

Η ανθρώπινη HDL στο πλάσμα χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλή ετερογένεια και αποτελείται από διακριτούς υποπληθυσμούς σωματιδίων, οι οποίοι διαφέρουν ως προς το σχήμα, τη λιπιδική και πρωτεϊνική σύσταση, την πυκνότητα, το μέγεθος και το φορτίο^[28,29] (Εικόνα 1.3).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τα αρχικά βήματα της πορείας βιογένεσης της HDL, η HDL σχηματίζει δισκοειδή σωματίδια, τα οποία στη συνέχεια υπόκεινται εκτενή αναδιοργάνωση και μετατρέπονται σε ώριμα, σφαιρικά HDL σωματίδια^[30] (Εικόνα 1.3Α). Αναλόγως της επιλεγμένης εργαστηριακής μεθόδου, τα HDL σωματίδια μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές κατηγορίες^[31]. Η χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας επιτρέπει την ταξινόμηση των HDL σωματιδίων σε δύο υποπληθυσμούς, με βάση το περιεχόμενό τους σε απολιποπρωτεΐνες^[32,33]. Οι κύριες απολιποπρωτεΐνες (απο) της HDL είναι η αποΑ-I, η οποία αποτελεί περίπου το 70% της πρωτεϊνικής της σύστασης και η αποΑ-II, η οποία απαντά σε ποσοστό ~20%. Τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται σε αυτά που περιέχουν μόνο αποΑ-I και σε αυτά που περιέχουν αποΑ-I και αποΑ-II^[34] (Εικόνα 1.3Β).

Σύμφωνα με την πυκνότητά τους, τα HDL σωματίδια διακρίνονται με υπερφυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας, σε δύο μεγάλες υποκατηγορίες, τα μεγαλύτερα και λιγότερο πυκνά HDL2 (1,063-1,125 g/mL) και τα μικρότερα HDL3 (1,125-1,21 g/mL) σωματίδια^[35] (Εικόνα 1.3Γ). Η ηλεκτροφόρηση μη αποδιατακτικής πηκτής πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας διαχωρίζει την HDL σε πέντε ξεχωριστούς υποπληθυσμούς, σύμφωνα με το μέγεθος των σωματιδίων ως εξής: HDL2b (9,7-12 nm), HDL2a (8,8-9,7 nm), HDL3a (8,2-8,8 nm), HDL3b (7,8-8,2 nm) και HDL3c (7,2-7,8 nm)^[36] (Εικόνα 1.3Δ). Επιπλέον, τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται με βάση το φορτίο και το σχήμα τους, σε πηκτή αγαρόζη, σε α-σωματίδια, τα οποία αποτελούνται κυρίως από τα σφαιρικά HDL

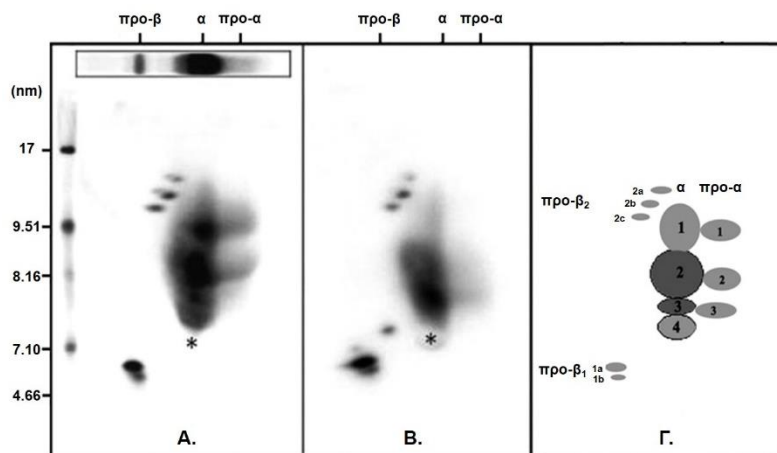
σωματίδια και σε προ-β-σωματίδια, τα οποία αποτελούνται από τα πρόδρομα HDL σωματίδια^[37] (Εικόνα 1.3Ε). Περαιτέρω, η ταξινόμηση της HDL με βάση το φορτίο και το μέγεθος επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση πηκτής δύο διαστάσεων, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Όμοια με παραπάνω, τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται στην πρώτη διάσταση με βάση το φορτίο τους και ταξινομούνται σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα, συγκριτικά με την αλβουμίνη, σε προ-β- (μικρότερη μεταναστευτική ικανότητα), α- (παρόμοια μεταναστευτική ικανότητα) και προ-α- (μεγαλύτερη μεταναστευτική ικανότητα) σωματίδια, ενώ στη δεύτερη διάσταση διαχωρίζονται με βάση το φορτίο και το μέγεθός τους σε δώδεκα διαφορετικούς υποπληθυσμούς^[38], όπως απεικονίζονται στην εικόνα 1.4Γ.



Εικόνα 1.3: Ετερογένεια της HDL. Η ανθρώπινη HDL του πλάσματος ταξινομείται σε διακριτούς υποπληθυσμούς, οι οποίοι διαφέρουν στο σχήμα (Α), τη σύσταση (Β), την πυκνότητα (Γ), το μέγεθος (Δ) και το φορτίο (Ε). (τροποποιημένη εικόνα από [30]).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει 2-5% προ-β-HDL σωματίδια και 95-98% α-HDL σωματίδια^[39]. Παράλληλα, μελέτες σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (coronary artery disease, CAD) που παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα HDL-C έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των υποπληθυσμών της α1-HDL και προ-α-HDL ήταν σημαντικά μειωμένα, ενώ τα επίπεδα του υποπληθυσμού της α3-HDL και των προ-β-σωματιδίων ήταν αυξημένα, σε σχέση με τα άτομα αναφοράς

των μελετών^[40,41] (Εικόνα 1.4A, B). Έχει προταθεί ότι τα επίπεδα των υποπληθυσμών της α1- και α2-HDL αποτελούν πιο αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες εμφάνισης μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων, συγκρινόμενα με τα επίπεδα της HDL-C^[41]. Επιπρόσθετα, μελέτες υποδεικνύουν ότι τα υψηλά επίπεδα του υποπληθυσμού της α1-HDL που περιέχει αποΑ-I, αλλά όχι αποΑ-II, οδηγούν σε βελτιωμένο αντιαθηρογόνο προφίλ^[42].



Εικόνα 1.4: Ανάλυση των υποπληθυσμών της HDL που περιέχουν αποΑ-I ανθρώπινου πλάσματος σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων. Τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται με βάση το φορτίο και το μέγεθός τους. Το ένθετο σχήμα στην εικόνα 1.4A αναπαριστά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1^η διάσταση), η οποία διαχωρίζει τα HDL σωματίδια σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα, συγκριτικά με την αλβουμίνη, σε προ-β-, α- και προ-α-σωματίδια. Ο αστερίσκος (*) αντιπροσωπεύει τη θέση της ανθρώπινης αλβουμίνης του πλάσματος (α-ηλεκτροφορητική κινητικότητα). **(Α)** Δείγμα HDL από φυσιολογικό άτομο. **(Β)** Δείγμα HDL από ασθενή με στεφανιαία νόσο που παρουσιάζει διαφοροποιήσεις στους υποπληθυσμούς της HDL. **(Γ)** Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμησης των υποπληθυσμών της HDL που περιέχουν αποΑ-I, σύμφωνα με το φορτίο και το μέγεθος των σωματιδίων. (τροποποιημένη εικόνα από [28]).

1.4 Απολιποπρωτεΐνη Α-I

Η αποΑ-I είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL και διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη βιοσύνθεση, τη δομή, την ωρίμανση, τον καταβολισμό, τις λειτουργίες, καθώς και στη ρύθμιση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα^[7]. Ανεπάρκεια της αποΑ-I και μεταλλάξεις στο γονίδιο της αποΑ-I έχουν συσχετιστεί με διαταραχές του μεταβολισμού της HDL που οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα HDL-C ή/και σε αυξημένη προδιάθεση εμφάνισης αθηροσκλήρωσης^[43-45]. Επιπλέον, *in vivo* μελέτες υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση της αποΑ-I οδηγεί σε αύξηση των

επιπέδων της HDL του πλάσματος και επιβραδύνει ή υποστρέφει τον σχηματισμό αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων σε αθηροσκληρωτικά μοντέλα ζώων^[46-49].

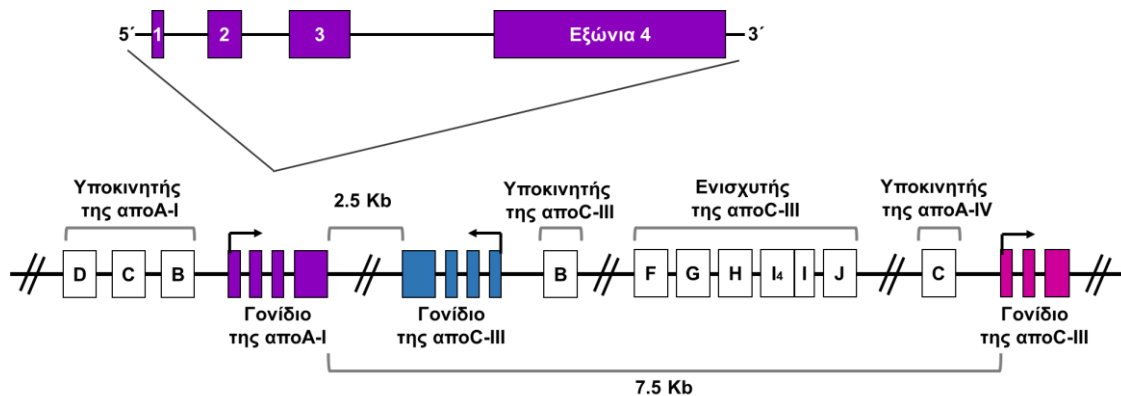
1.4.1 Το γονίδιο της αποΑ-I και η μεταγραφική του ρύθμιση

Το γονίδιο της ανθρώπινης αποΑ-I εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και το έντερο και σε πολύ λιγότερο βαθμό σε άλλους ιστούς^[11]. Έχει μήκος 1863 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp) και αποτελείται από τέσσερα εξώνια και τρία ιντρόνια^[50]. Χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδίου της αποΑ-I έδειξε ότι εδράζεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11q23, στην ίδια συστάδα με τα γονίδια της αποC-III και της αποΑ-IV^[51-53] (Εικόνα 1.5).

Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της αποΑ-I συμβαίνει πρωτίστως σε μεταγραφικό επίπεδο^[54]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ηπατική έκφραση του γονιδίου της αποΑ-I ελέγχεται κυρίως από τον υποκινητή της^[55,56]. Η περιοχή του υποκινητή περιέχει πολλαπλές θέσεις δέσμησης πυρηνικών παραγόντων (nuclear factors, NF), οι οποίοι αποκρίνονται σε ποικίλους ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς προσδέτες^[54,57] (Εικόνα 1.5). Έχει βρεθεί ότι κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση του υποκινητή της αποΑ-I διαδραματίζουν δύο στοιχεία απόκρισης ορμονών (hormone response elements, HREs), τα οποία δεσμεύουν μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων των ορμονών^[55]. Έναν από τους πυρηνικούς υποδοχείς που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της αποΑ-I αποτελεί ο πυρηνικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων -4 (hepatocyte nuclear factor-4, HNF-4)^[58]. Επίσης, μελέτες σε πειραματόζωα και κυτταρικές καλλιέργειες υποδεικνύουν ότι ο PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α , υποδοχέας που ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων) συμμετέχει στη ρύθμιση του γονιδίου της αποΑ-I στο ήπαρ και το έντερο. Σε απόκριση των φιμπρατών ο PPAR α προσδένεται στην περιοχή του υποκινητή της αποΑ-I ως ετεροδιμερές με τον RXR α (retinoid X receptor, υποδοχέας X ρετινοειδών) και αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου της αποΑ-I^[55,59]. Αντιθέτως, οι LXR (liver X receptor, υποδοχέας X ήπατος) και FXR (farnesoid X receptor, υποδοχέας X φαρνεσοειδών) είναι αρνητικοί ρυθμιστές της μεταγραφής του γονιδίου της αποΑ-I^[60,61].

Επιπρόσθετα, μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα μυών έδειξαν ότι η βέλτιστη έκφραση του γονιδίου της αποΑ-I στο ήπαρ και το έντερο απαιτεί την παρουσία του ενισχυτή του υποκινητή του γονιδίου της αποC-III (Εικόνα 1.5). Η ρυθμιστική

αυτή περιοχή, η οποία συντονίζει την έκφραση της συστάδας των γονιδίων των apoA-I/apoC-III/apoA-IV, περιέχει δύο HREs που προσδένουν τον HNF-4, καθώς και δύο θέσεις δέσμησης για τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (specificity protein 1, πρωτεΐνη εξειδίκευσης 1)^[62,63]. Τέλος, εκτός από τους προαναφερθέντες πυρηνικούς υποδοχείς, υπάρχει μια ποικιλία άλλων παραγόντων, όπως οι κυτταροκίνες, ορμονικοί και φαρμακολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου της apoA-I^[64].



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση της συστάδας των γονιδίων των apoA-I/apoC-III/apoA-IV. Με γράμματα συμβολίζονται οι περιοχές των ρυθμιστικών αλληλουχιών των γονιδίων. (τροποποιημένη εικόνα από [39]).

1.4.2 Βιοσύνθεση της apoA-I

Το αρχικό πεπτιδικό προϊόν που προκύπτει από τη μεταγραφή και μετάφραση του γονιδίου της apoA-I αποτελείται από 267 αμινοξικά κατάλοιπα (αα), συμπεριλαμβανομένης μίας αμινο (N)-τελικής σηματοδοτικής αλληλουχίας 18αα (πρε-προ-apoA-I)^[65]. Κατά τη μετατόπιση της πρε-προ-apoA-I μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου η σηματοδοτική αλληλουχία των 18αα του πρε-προ-πεπτιδίου υπόκειται ενδοκυτταρική πέψη από την πεπτιδάση σήματος και η προ-apoA-I εκκρίνεται στο πλάσμα ή τη λέμφο. Η ωρίμανση της apoA-I περιλαμβάνει την εξωκυτταρική υδρόλυση 6αα από το N-τελικό άκρο του προ-πεπτιδίου, από την πρωτεάση BMP-1 (bone morphogenetic protein-1, οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-1)^[66]. Η ώριμη apoA-I αποτελείται από 243αα με υπολογίσιμη μοριακή μάζα ~28 kDa^[50].

Πολλές από τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL, οι οποίες θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω, μεσολαβώνονται από την apoA-I. Η ικανότητα της apoA-I να αλληλεπιδρά με διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς και ένζυμα προϋποθέτει μεγάλη διαμορφωτική πλαστικότητα της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα,

πληθώρα μελετών υποστηρίζει ότι η δομή της αποΑ-I συμβάλλει σημαντικά στις λειτουργίες τόσο της ελεύθερης λιπιδίων πρωτεΐνης, όσο και της λιπιδιωμένης.

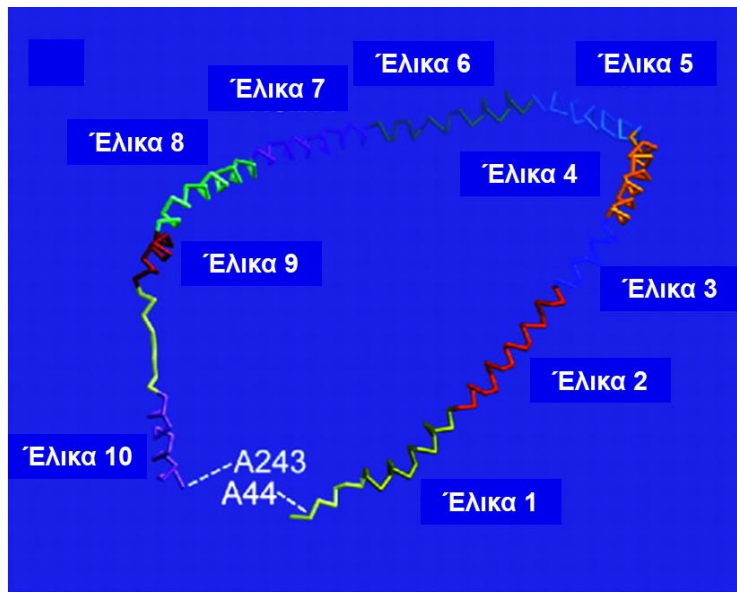
1.4.3 Η δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I

Στην ανθρώπινη αποΑ-I, τα N-τελικά κατάλοιπα 1-43 κωδικοποιούνται από το εξώνιο 3 και θεωρείται ότι σχηματίζουν μια G έλικα, ενώ η περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξικά κατάλοιπα 44-243 κωδικοποιείται από το εξώνιο 4 και περιέχει δομικές επαναλήψεις 22- και 11- καταλοίπων^[67-69]. Οι επαναλήψεις αυτές οργανώνονται σε αμφιπαθείς α-έλικες των κλάσεων A και Y, οι οποίες διακόπτονται μεταξύ τους από κατάλοιπα προλίνης^[68,70]. Μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού (circular dichroism, CD) έχουν δείξει ότι η δευτεροταγής δομή της αποΑ-I περιέχει ποσοστό α-έλικας περίπου 50%^[71-73]. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με φασματοσκοπικά δεδομένα που έχουν προκύψει από πειράματα ισοτοπικής ανταλλαγής υδρογόνου-δευτερίου (hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry, HDX-MS) και υποδεικνύουν ότι το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (7-115αα) έχει διαμόρφωση α-έλικας, ενώ το καρβοξυ (C)-τελικό άκρο (179-243αα) έχει διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος^[74,75]. Επίσης, μελέτες υποστηρίζουν ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-43 επηρεάζουν αμφότερα τη σταθερότητα και τη διαμόρφωση της αποΑ-I σε διάλυμα^[72,76]. Έχει δειχθεί ότι η αποΑ-I σε διάλυμα απαντά ως μείγμα μονομερών, τα οποία παρουσιάζουν διαμόρφωση ελικοειδούς δεματίου ή επιμήκη ελικοειδή διαμόρφωση φουρκέτας^[77]. Επιπρόσθετα, μελέτες της θερμοδυναμικής σταθερότητας της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I σε διάλυμα υποδηλώνουν ότι φέρει χαρακτηριστικά «τηγμένης σφαιρικής» (“molten globule”) πρωτεΐνης και ότι στερείται καθορισμένης τριτοταγούς δομής^[71,72,78].

Λόγω των ιδιαίτερων δομικών χαρακτηριστικών που φέρει η αποΑ-I και της μεγάλης ευελιξίας του μορίου της, δεν έχει κρυσταλλογραφηθεί ακόμα η πλήρης μήκους αποΑ-I. Ωστόσο, έχουν επιλυθεί δύο κρυσταλλογραφικές δομές της ελλειμματικής ανθρώπινης αποΑ-I, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής στο N-τελικό άκρο αποΑ-I, αποΑ-I[Δ(1-43)] (PDB: 1AV1)^[79] και της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής στο C-τελικό άκρο αποΑ-I, αποΑ-I[Δ(185-243)] (PDB: 3R2P)^[80], οι οποίες παρέχουν δεδομένα για την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Η κρυσταλλική δομή, σε ανάλυση 4 Å, της αποΑ-I[Δ(1-43)] έδειξε ότι το μονομερές μόριο υιοθετεί μία έντονα πεταλοειδή διαμόρφωση. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 44-243 του μονομερούς της αποΑ-I, εκτός της περιοχής που βρίσκεται

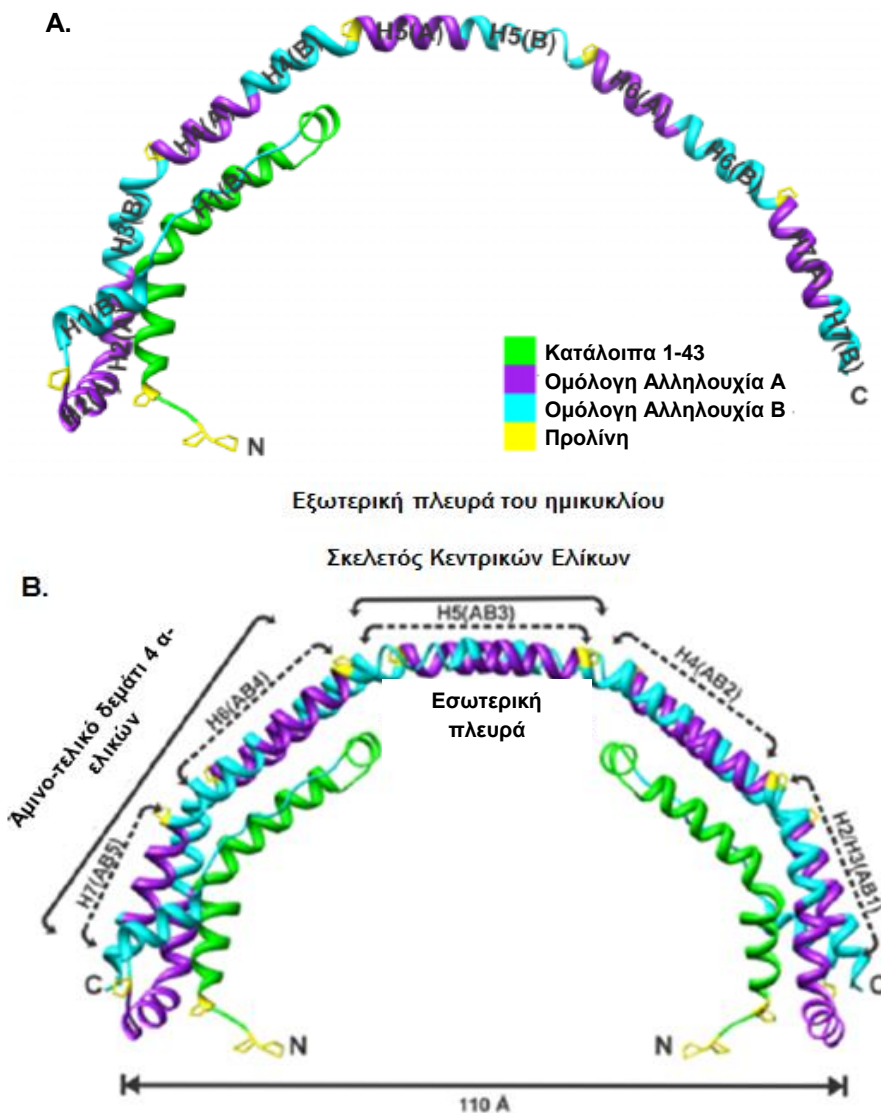
μεταξύ των καταλοίπων 220 και 227, συνιστούν μια σχεδόν συνεχή αμφιπαθή α-έλικα, η οποία διακόπτεται κατά διαστήματα από κατάλοιπα προλίνης, τα οποία εντοπίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις και κάμπτουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αυτή η καμπυλότητα του μορίου τοποθετεί το N-τελικό και C-τελικό άκρο το ένα κοντά στο άλλο, παρά το γεγονός ότι οι διαστάσεις του μονομερούς είναι $125 \times 80 \times 40 \text{ \AA}$ (Εικόνα 1.6)^[79,81].



Εικόνα 1.6. Η κρυσταλλική δομή, σε ανάλυση 4 \AA , της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της apoA-I στο N-τελικό της άκρο, apoA-I[$\Delta(1-43)$]. (τροποποιημένη εικόνα από [79]).

Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή, σε ανάλυση 2.2 \AA , της apoA-I[$\Delta(185-243)$], το μονομερές μόριο της apoA-I σχηματίζει ημικύκλιο (Εικόνα 1.7A). Κάθε μονομερές αλληλεπιδρά με ένα σχετικά συμμετρικό μόριο για να σχηματίσουν ένα ομοδιμερές με ημικυκλική αρχιτεκτονική, με ύψος $\sim 17 \text{ \AA}$ και διάμετρο $\sim 110 \text{ \AA}$. Ο σκελετός του διμερούς αποτελείται από δύο μακριές αντιπαράλληλες έλικες (helix, H), οι οποίες συνίστανται από διαδοχικές επαναλήψεις αλληλουχιών (τύπου A και B) και χωρίζονται μεταξύ τους από κατάλοιπα προλίνης. Στο άκρο κάθε διμερούς σχηματίζεται ένα δεμάτι που αποτελείται από τέσσερις α-έλικες και ένα εκτεταμένο τμήμα. Τα κατάλοιπα 1-43 του κάθε μονομερούς σχηματίζουν την πρώτη έλικα, ενώ μία εκτεταμένη αλυσίδα και μια δεύτερη κοντύτερη περιοχή με ελικοειδή μορφή αποτελούν τη σύνδεση με την τρίτη μακρύτερη παράλληλη έλικα του δεματίου σε κάθε μονομερές. Η τέταρτη έλικα σχηματίζεται από τα C-τελικά κατάλοιπα του συμμετρικά συσχετιζόμενου μορίου και ενσωματώνεται στο δεμάτι, αποκρύπτοντας τα υδρόφοβα κατάλοιπα και σταθεροποιώντας τη δομή του

δεματίου. Αυτή η οργάνωση οδηγεί στην αλληλεπίδραση των κεντρικών ελίκων (H5, AB3), στην οποία οι δύο αντιπαράλληλες έλικες συνδέουν το δεμάτι ελίκων στο κάθε του άκρο (Εικόνα 1.7B)^[80].

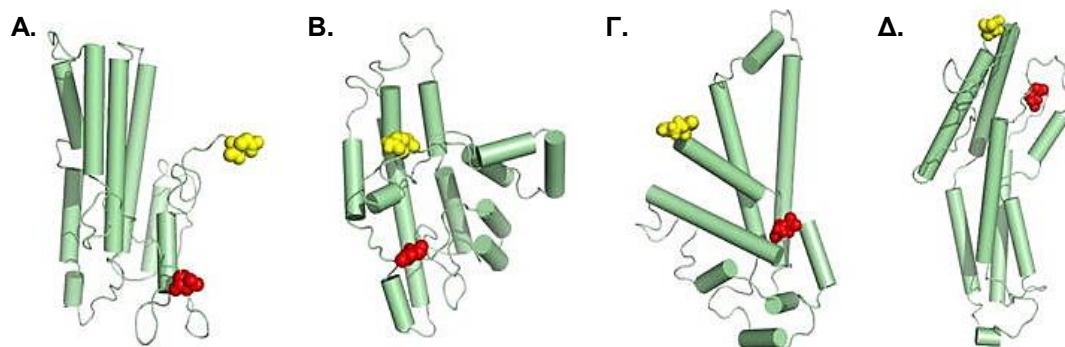


Εικόνα 1.7. Η κρυσταλλική δομή, σε ανάλυση 2.2 Å, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της apoA-I στο C-τελικό της άκρο, apoA-I[Δ(185-243)]. (A) Η δομή του μονομερούς της apoA-I[Δ(185-243)]. (B) Ένα μονομερές αλληλεπιδρά με ένα σχετικά συμμετρικό μόριο για να σχηματιστεί ένα ομοδιμερές. Κάθε μονομερές αποτελείται από 5 AB επαναλήψεις. Το N-τελικό άκρο κάθε μονομερούς σχηματίζει ένα δεμάτι 4 α-ελίκων με το C-τελικό άκρο του συμμετρικού μονομερούς. Η: έλικα (helix). (τροποποιημένη εικόνα από [80]).

Η δομή του δεματίου σταθεροποιείται από δύο αρωματικά συμπλέγματα, ένα στο κάθε άκρο του διμερούς, καθώς και από δύο αλληλεπιδράσεις π-κατιόντων^[80]. Επιπλέον, οι κεντρικές αντιπαράλληλες έλικες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των υδρόφοβων καταλοίπων λευκίνης, συμβάλλοντας στη

σταθεροποίηση της δομής του μορίου^[80]. Περαιτέρω, η δομή του διμερούς σταθεροποιείται περισσότερο μέσω γεφυρών άλατος που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των φορτισμένων καταλοίπων του κάθε μονομερούς, αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις των δύο μονομερών^[69,80].

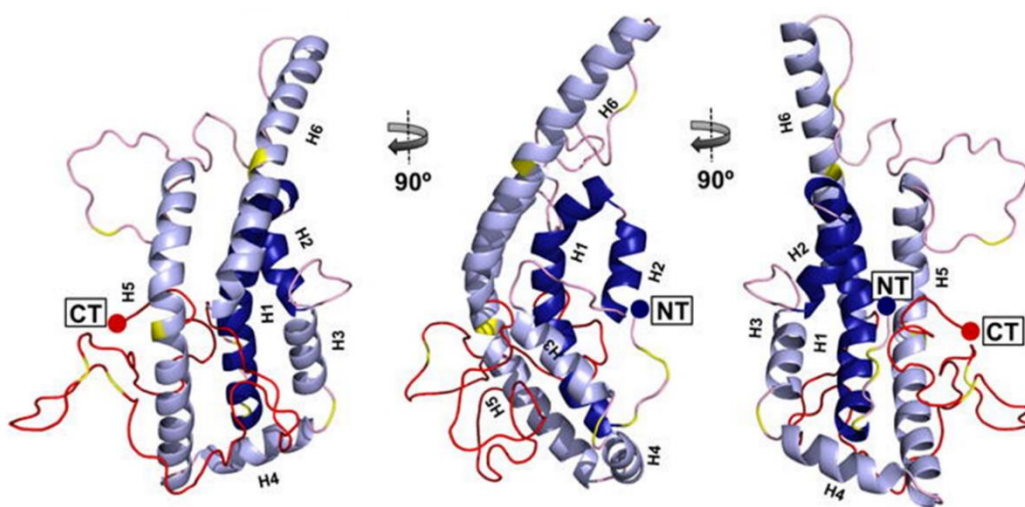
Παρά το γεγονός ότι δεν έχει επιλυθεί η δομή της πλήρους μήκους αποA-I, αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν προταθεί οχτώ διαφορετικά μοντέλα για το μονομερές της πρωτεΐνης, από τέσσερις ερευνητικές ομάδες^[73,82-84], τα οποία έχουν προκύψει με τη χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως CD, φασματοσκοπία φθορισμού, μεθόδους χημικής διασύνδεσης, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής και άλλες. Στην εικόνα 1.8 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των μοντέλων. Συνολικά, τα δεδομένα συνηγορούν στο γεγονός ότι η αποA-I σχηματίζει ένα δεμάτι τεσσάρων ελίκων, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης λιπιδίων. Ωστόσο, τα μοντέλα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους σε μεγάλο βαθμό, ως προς το σχήμα, τη δευτεροταγή δομή και τον εντοπισμό των N- και C-τελικών άκρων της αποA-I.



Εικόνα 1.8. Χαρακτηριστικά μοντέλα της ελεύθερης λιπιδίων πλήρους μήκους αποA-I. (A) Μοντέλο της αποA-I βασισμένο σε μεθόδους χημικής διασύνδεσης και ομόλογης αλληλουχίας. **(B)** Μοντέλο της αποA-I βασισμένο σε μεθόδους χημικής διασύνδεσης και σημειακές μεταλλάξεις καταλοίπων κυστεΐνης. **(Γ)** Μοντέλο της αποA-I βασισμένο σε μεθόδους χημικής διασύνδεσης και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. **(Δ)** Μοντέλο της αποA-I βασισμένο σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Τα μοντέλα απεικονίζονται σε μορφή cartoon και οι πράσινοι κύλινδροι αναπαριστούν δομή α-έλικας. Το N- και C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης αναπαρίστανται με κόκκινο και κίτρινο χρώμα, αντίστοιχα. (τροποποιημένη εικόνα από **[85]**).

Λόγω της αναγκαιότητας της κατανόησης της σχέσης της δομής της αποA-I με τη λειτουργία της ελεύθερης λιπιδίων και λιπιδιωμένης αποA-I, προτάθηκε πρόσφατα, από τη σύμπραξη δέκα ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται με την επίλυση της δομής της αποA-I, ένα «συναινετικό» (consensus) μοντέλο της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων αποA-I (Εικόνα 1.9)^[85]. Σύμφωνα με το

μοντέλο αυτό, η ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I οργανώνεται σε δύο δομικές περιοχές, την αμινο-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει ένα δεμάτι α-ελίκων και την καρβοξυ-τελική περιοχή (180-243αα), η οποία παρουσιάζει μια λιγότερο οργανωμένη δομή, κυρίως τυχαίου σπειράματος. Το ελικοειδές δεμάτι αποτελείται από τρεις κύριες α-έλικες (H1: 8-35αα, H5: 81-115αα και H6: 148-179αα) και τρεις μικρότερες ελικοειδείς περιοχές (H2: 37-45αα, H3: 54-64 και H4: 68-78αα), οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ αυτών. Οι έξι έλικες διατάσσονται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι μη πολικές επιφάνειές τους να προσανατολίζονται προς το εσωτερικό του δεματίου, το οποίο σταθεροποιείται κυρίως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία είναι εκτεθειμένα στον διαλύτη και πιθανότατα συμβάλλουν στη χαμηλή θερμοδυναμική σταθερότητα της πρωτεΐνης^[86]. Επιπρόσθετα, με βάση το «συναινετικό» μοντέλο, το N- και C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκονται σε εγγύτητα. Το γεγονός αυτό ίσως εξηγεί μελέτες^[78,80,83,85,87], οι οποίες υποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις των δύο δομικών περιοχών επηρεάζουν τη συνολική αναδίπλωση και σταθερότητα του μορίου της αποΑ-I, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τα λιπίδια.

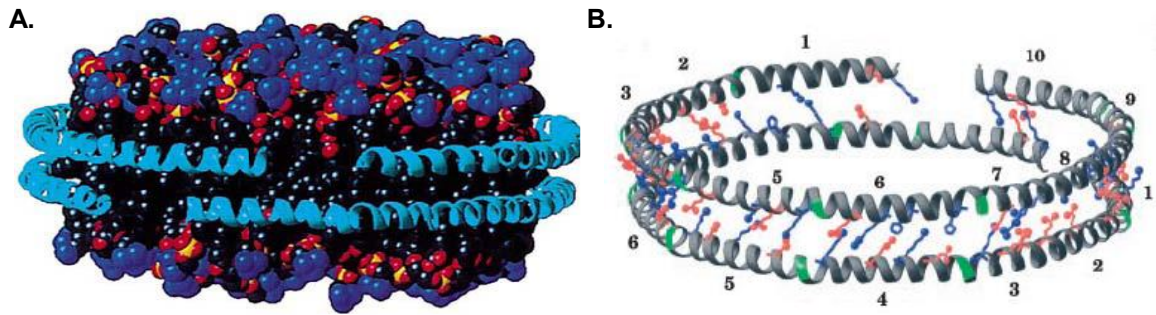


Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου «συναινετικού» μοντέλου της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I. Με έντονο μπλε χρώμα αναπαρίστανται οι έλικες 1 και 2, ενώ με ανοιχτό μπλε οι έλικες 3-6. Με ροζ χρώμα απεικονίζονται οι δομικές περιοχές της αποΑ-I που θεωρείται ότι παρουσιάζουν διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η καρβοξυ-τελική περιοχή της αποΑ-I, ενώ με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι θέσεις των καταλοίπων της προλίνης στην αμινοξική αλληλουχία της αποΑ-I. Η: έλικα (helix), CT: καρβοξυ-τελικό άκρο (C-terminal), NT: αμινο-τελικό άκρο (N-terminal). (τροποποιημένη εικόνα από [85]).

1.4.4 Η δομή της λιπιδιωμένης αποΑ-I

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες, ώστε να εξαχθούν πληροφορίες για τη διαμόρφωση του μορίου της αποΑ-I στη λιπιδιωμένη κατάσταση^[69,88-90]. Με βάση δομικές και φυσικοχημικές μελέτες έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για τον τρόπο με τον οποίο η αποΑ-I οργανώνεται στα δισκοειδή και σφαιρικά HDL σωματίδια^[74,89,91-93].

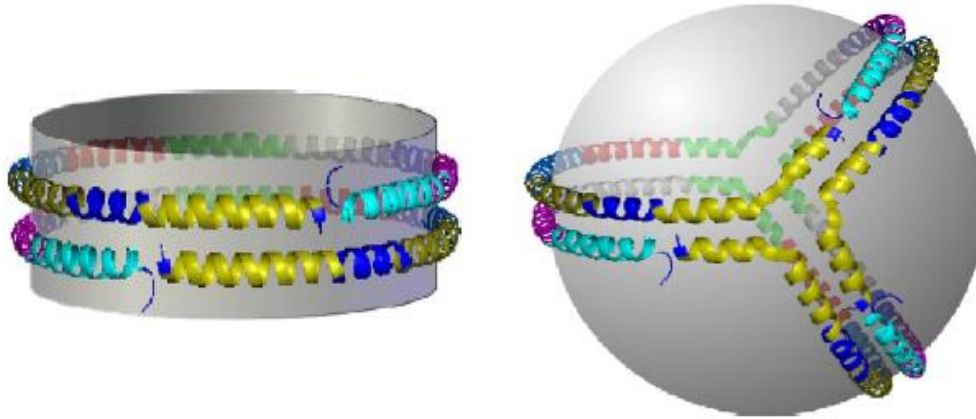
Η επίλυση της δομής της αποΑ-I[Δ(1-43)] από τον Bohrani εισήγαγε την ιδέα του μοντέλου «ζώνης», για να εξηγήσει τη δομή της αποΑ-I στα δισκοειδή σωματίδια. Αυτή η οργάνωση της αποΑ-I υποστηρίζεται από πλήθος μελετών^[94-97]. Σύμφωνα με το μοντέλο «διπλής ζώνης» (“double belt”), δύο μόρια αποΑ-I τυλίγονται με αντιπαράλληλο προσανατολισμό γύρω από μία δισκοειδή διπλοστιβάδα, η οποία αποτελείται από 160 μόρια φωσφολιπιδίων^[92] (Εικόνα 1.10Α). Έχει προταθεί ότι η έλικα 5 του ενός μονομερούς αλληλεπιδρά με την έλικα 5 του άλλου μονομερούς (LL5/5) και ο προσανατολισμός των δύο μονομερών είναι τέτοιος, ώστε να μεγιστοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις δεσμών άλατος μέσα στο κάθε μόριο (Εικόνα 1.10Β). Η αλληλεπίδραση της αποΑ-I με τα φωσφολιπίδια οδηγεί στην αύξηση του περιεχόμενου ποσοστού α-έλικας του μορίου της σε λιπιδιωμένη κατάσταση και θεωρείται ότι το μόριο της αποΑ-I υιοθετεί μία σχεδόν συνεχή ελικοειδή διαμόρφωση (εκτός από τα κατάλοιπα 1-6 και 237-243) στη λιπιδιωμένη κατάσταση^[90,92]. Οι αμφιπαθείς έλικες του κάθε μονομερούς της αποΑ-I σχηματίζουν έναν δακτύλιο με 3.67 κατάλοιπα ανά στροφή έλικας, όπου η υδρόφοβη επιφάνεια «κοιτάζει» εσωτερικά προς τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Μία τέτοια έλικα ονομάζεται «11/3» και διαγράφει 3 πλήρεις στροφές ανά 11 αμινοξικά κατάλοιπα. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ο μετασχηματισμός των δισκοειδών HDL σωματιδίων σε σφαιρικά, που λαμβάνει χώρα μέσω της δράσης της LCAT, περιλαμβάνει τη μετατροπή της 11/3 έλικας σε πραγματική α-έλικα με 3.6 αμινοξικά κατάλοιπα ανά στροφή^[92].



Εικόνα 1.10. Το μοντέλο «διπλής ζώνης» (“double belt”) της δισκοειδούς HDL. (Α) Δύο μόρια apoA-I[Δ(1-43)] (έλικες με γαλάζιο χρώμα) τυλίγονται με αντιπαράλληλο προσανατολισμό γύρω από μία διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων διαμέτρου 85 Å. **(Β)** Σχηματική απεικόνιση των δεσμών άλατος που θεωρείται ότι σχηματίζονται μεταξύ των δύο μονομερών της apoA-I[Δ(1-43)]. (τροποποιημένη εικόνα από [92]).

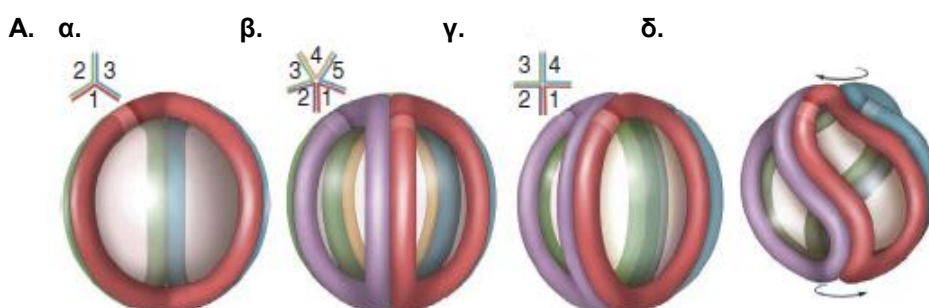
Μέχρι την προηγούμενη δεκαετία υπήρχαν σχετικά λίγες πληροφορίες για τη διαμόρφωση που υιοθετεί η apoA-I στα σφαιρικά HDL σωματίδια, συγκριτικά με τα δισκοειδή. Γενικά, η μετατροπή των δισκοειδών HDL σωματιδίων σε σφαιρικά απαιτεί την αναδιάταξη της δομής της apoA-I στην επιφάνεια της δισκοειδούς HDL, ώστε να επιτρέψει τη μετάβαση στη σφαιρική μορφή.

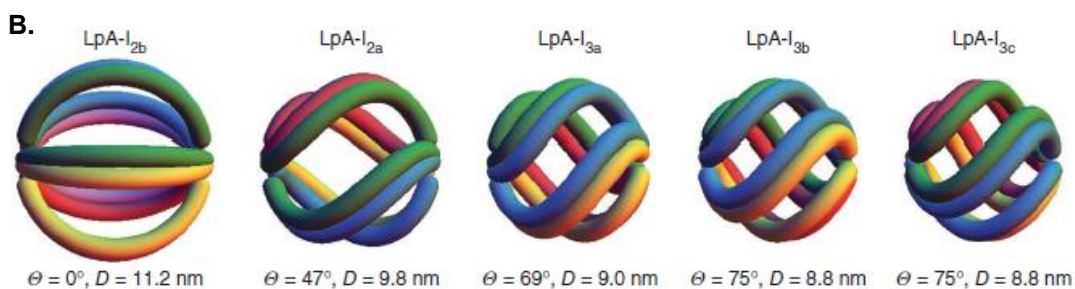
Ο Davidson και οι συνεργάτες του, το 2008, παρήγαγαν σφαιρικά σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL διαφορετικής διαμέτρου (93, 80 Å) από δισκοειδή σωματίδια και συνέκριναν τις δομές της apoA-I στα διαφορετικά είδη των σωματιδίων. Χρησιμοποιώντας μεθόδους διασύνδεσης (cross-linking) και φασματομετρία μάζας, διαπίστωσαν 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 των 93 Å υπήρχαν 3 μόρια apoA-I αντί για 2 που υπήρχαν στα δισκοειδή. Για τη διαμόρφωση των 3 μορίων apoA-I στα σφαιρικά HDL σωματίδια πρότειναν το μοντέλο «τριφύλλι» (“trefoil”), βασισμένοι στο μοντέλο «διπλής ζώνης». Οι έλικες 5 και 10 του κάθε μονομερούς της apoA-I κάμπτονται με τέτοιο τρόπο, ώστε το ήμισυ κάθε δακτυλίου να μπορεί να καμφθεί 60° εκτός του επιπέδου του σωματιδίου. Έτσι, ένα τρίτο μόριο apoA-I μπορεί να καμφθεί κατά τον ίδιο τρόπο και να τοποθετηθεί μεταξύ των δύο αρχικών μορίων της apoA-I. Η διάταξη αυτή διαχωρίζει την επιφάνεια της σφαίρας σε τρία ίσα μέρη (μηνίσκοι)^[98] (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11. Σύγκριση των αλληλεπιδράσεων των μορίων της apoA-I σε ένα δισκοειδές σωματίδιο «διπλής ζώνης» (“double belt”) και σε ένα σφαιρικό σωματίδιο «τριφύλλι» (“trefoil”). Κάθε α-έλικα παριστάνεται με διαφορετικό χρώμα. Οι αλληλεπιδράσεις έλικας-έλικας που απαντούν στο δισκοειδές σωματίδιο μεταξύ των δύο μονομερών της apoA-I απαντούν επίσης και στο μοντέλο «τριφύλλι» μεταξύ των τριών μονομερών της apoA-I. (τροποποιημένη εικόνα από [99]).

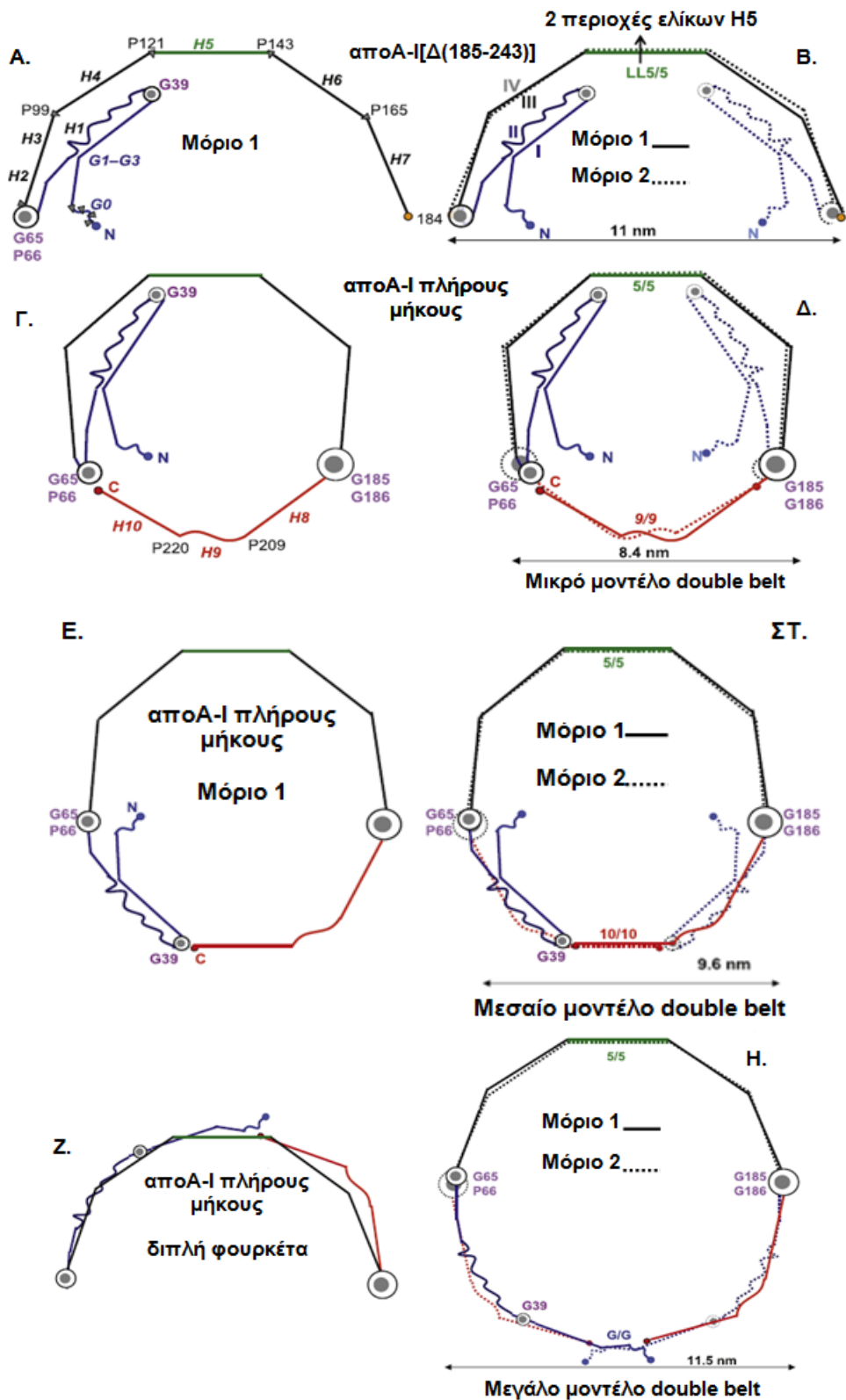
Η ίδια ερευνητική ομάδα, το 2011, διαχώρισε ανθρώπινη HDL σε πέντε διαφορετικές πυκνότητες υποπληθυσμών και στη συνέχεια απομόνωσαν αυτές που περιείχαν μόνο την apoA-I (LpA-I). Χρησιμοποιώντας μεθόδους χημικής διασύνδεσης και φασματομετρία μάζας, καθόρισαν τον αριθμό των μορίων της apoA-I που περιέχονται στα σφαιρικά σωματίδια, ανάλογα με τη διάμετρό τους (Εικόνα 1.12A). Επιπλέον, έδειξαν ότι η apoA-I σε αυτά τα σωματίδια υιοθετεί έναν δομικό σκελετό που ομοιάζει πολύ με αυτόν της συνθετικής HDL. Προσάρμοσαν καθιερωμένες δομές συνθετικής HDL για να παράγουν τα πρώτα λεπτομερή μοντέλα αυθεντικής HDL του ανθρώπινου πλάσματος. Τα μοντέλα αυτά υποδεικνύουν ότι η apoA-I υιοθετεί συμμετρική δομή που ομοιάζει με κλουβί και το μέγεθος της HDL διαμορφώνεται με την περιστροφική κίνηση των ήδη υπάρχοντων μορίων της apoA-I (Εικόνα 1.12B). Επίσης, διαπίστωσαν ότι η apoA-I υιοθετεί μία κοινή δομική οργάνωση σε όλα τα σωματίδια, η οποία χαρακτηρίζεται από διακριτές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, ανεξάρτητα από το σχήμα και το μέγεθος των σωματιδίων αυτών^[99].





Εικόνα 1.12. Το μοντέλο «τριφύλλι» (“trefoil”) των σφαιρικών HDL σωματιδίων του ανθρώπινου πλάσματος. (A) Ενσωμάτωση των πρόσθετων μορίων apoA-I στο μοντέλο «τριφύλλι» και προσαρμογή των μορίων της apoA-I σε σωματίδια με μικρότερη διάμετρο. α) Σχηματική απεικόνιση τριών μορίων apoA-I στο μοντέλο «τριφύλλι», με κάθε μόριο apoA-I να παριστάνεται με διαφορετικό χρώμα. β) Το πενταμερές σύμπλοκο που προτείνεται για τη δομή της LpA-I_{2b}. γ) Ένα εξιδανικευμένο, πλήρως εκτεταμένο, τετραμερές σύμπλοκο. δ) Ένα συστραμμένο, τετραμερές σύμπλοκο μικρότερης διαμέτρου, όπως προτείνεται για τη δομή της LpA-I_{2a}. (B) Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής περιστροφής που απαιτείται να επιτύχουν τα μόρια της apoA-I στα σφαιρικά σωματίδια της HDL, ώστε να διαμορφώσουν κατάλληλα το μέγεθός τους. Οι α-έλικες της apoA-I αναπαρίστανται σαν εκτεταμένοι σωλήνες κατά μήκος της επιφάνειας της HDL, όπου κάθε μόριο apoA-I έχει διαφορετικό χρώμα. Η LpA-I_{2b} αποτελείται από 5 μόρια apoA-I που εκτείνονται στον μέγιστο βαθμό. Τα μικρότερα σωματίδια περιέχουν τέσσερα μόρια apoA-I, και κάθε μόριο έχει περιστραφεί με γωνία θ . (τροποποιημένη εικόνα από [100]).

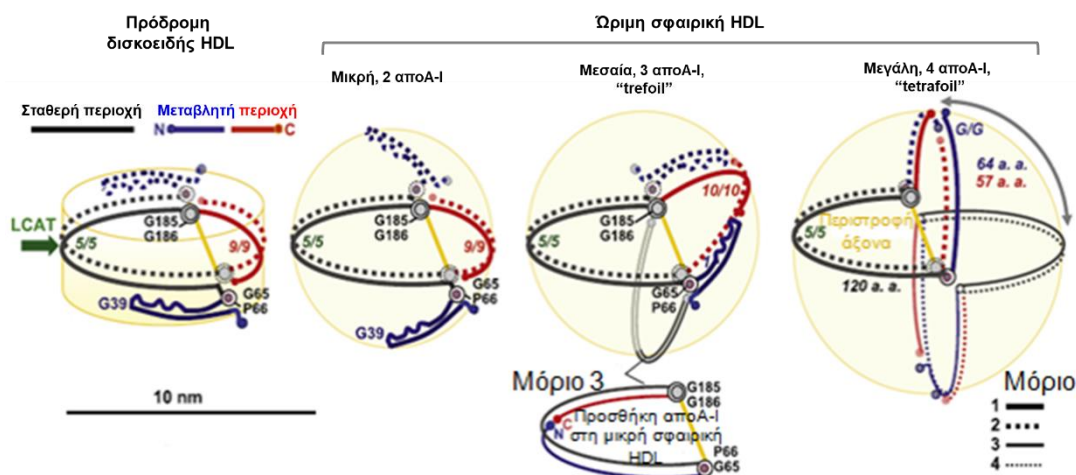
Σχετικά πρόσφατα, προτάθηκε ένας μοριακός μηχανισμός για τη διαμόρφωση της apoA-I πλήρους μήκους, καθώς αυτή προσλαμβάνει λιπίδια, ο οποίος είναι βασισμένος στο μοντέλο «διπλής ζώνης». Η διαμόρφωση της apoA-I στα μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους HDL σωματίδια, που έχει προταθεί, βασίζεται στην αλληλουχία επαναλήψεων α-ελίκων και την κρυσταλλική δομή της apoA-I[$\Delta(185-243)$]^[80] και επιβεβαιώνεται από εκτεταμένα δεδομένα βιοφυσικών πειραμάτων από πολλές ερευνητικές ομάδες. Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτόν, η κεντρική αλληλουχία της apoA-I στο μοντέλο «διπλής ζώνης» (σταθερή περιοχή 66-184αα) είναι δομικά συντηρημένη, ενώ τα N- και C-τελικά άκρα (μεταβλητές περιοχές 1-65αα και 185-243αα, αντίστοιχα) αναδιαμορφώνονται, καθώς το σωματίδιο της HDL επιμηκύνεται (Εικόνα 1.13). Η επιμήκυνση του κάθε μορίου της apoA-I επιτυγχάνεται με το σταδιακό ξεδίπλωμα του N-τελικού άκρου γύρω από δύο εύκαμπτες περιοχές που περιέχουν τα κατάλοιπα G39 και G65, καθώς και τη συντονισμένη ταλάντωση γύρω από τις “αρθρώσεις” G65-P66 και G185-G186, προκειμένου η apoA-I να «αγκαλιάζει» συνέχεια τον πυρήνα λιπιδίων, καθώς μεγαλώνει το σωματίδιο της HDL^[100].



Εικόνα 1.13. Αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της apoA-I πλήρους μήκους στο μοντέλο «διπλής ζώνης», βασισμένο στην κρυσταλλική δομή της apoA-I[$\Delta(185-243)$]. Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της apoA-I[$\Delta(185-243)$] ενός μονομερούς (**A**) και ενός κρυσταλλογραφικού διμερούς (**B**) μορίων apoA-I με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. G0–G3: κατάλοιπα 1–43, H1–H7: κατάλοιπα 44–184, P: προλίνη, G: γλυκίνη. Προτεινόμενη

διαμόρφωση της πλήρους μήκους αποΑ-I (Γ) σε ένα μικρό μοντέλο «διπλής ζώνης» διαμέτρου 8,4 nm μονομερούς και (Δ) διμερούς, (Ε) σε ένα μεσαίο μοντέλο «διπλής ζώνης» διαμέτρου 9,6 nm μονομερούς και (ΣΤ) διμερούς, (Η) σε ένα μεγάλο μοντέλο «διπλής ζώνης» διαμέτρου 11,5 nm διμερούς. Στο (Ζ) απεικονίζεται ένα μονομερές της αποΑ-I σε πλήρη έκταση με διαμόρφωση διπλής φουρκέτας που σχηματίζεται από την περιστροφή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γύρω από τις “αρθρώσεις” G65-P66 και G185-G186. Οι ευθείες γραμμές αντιπροσωπεύουν τμήματα α-ελίκων, ενώ οι κυματιστές γραμμές όχι, όπως παρατηρήθηκαν στις κρυσταλλικές δομές των ελλειμματικών μορφών της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I, αποΑ-I[Δ(1-43)] και αποΑ-I[Δ(185-243)]. Μπλε: αμινοτελική μεταβλητή περιοχή (G και H1), Μαύρο: σταθερή περιοχή (H2-H7), εκτός από τις κεντρικές επαναλήψεις, Πράσινο: περιοχή H5, Κόκκινο: καρβοξυ-τελική περιοχή (H8-H10). (τροποποιημένη εικόνα από [101]).

Παράλληλα, η ίδια ερευνητική ομάδα προτείνει πως αλλάζει η διαμόρφωση της αποΑ-I, καθώς το σωματίδιο της HDL μετατρέπεται από δισκοειδές σε σφαιρικό. Ο μηχανισμός που ακολουθείται είναι ο ίδιος, με τη διαφορά ότι στα σφαιρικά σωματίδια αυξάνεται ο αριθμός των μορίων της αποΑ-I και υπάρχει κλίση ανάμεσα στη σταθερή και μεταβλητή περιοχή της ίδιας αποΑ-I, η οποία εξαρτάται από τον αριθμό των μορίων της αποΑ-I (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14. Σχηματική αναπαράσταση της προτεινόμενης διαμόρφωσης της αποΑ-I πλήρους μήκους σε δισκοειδή και σφαιρικά HDL σωματίδια, μετά τη δράση της LCAT, καθώς αυτά μεγαλώνουν σε μέγεθος με την πρόσληψη χοληστερόλης. P: προλίνη, G: γλυκίνη. (τροποποιημένη εικόνα από [101]).

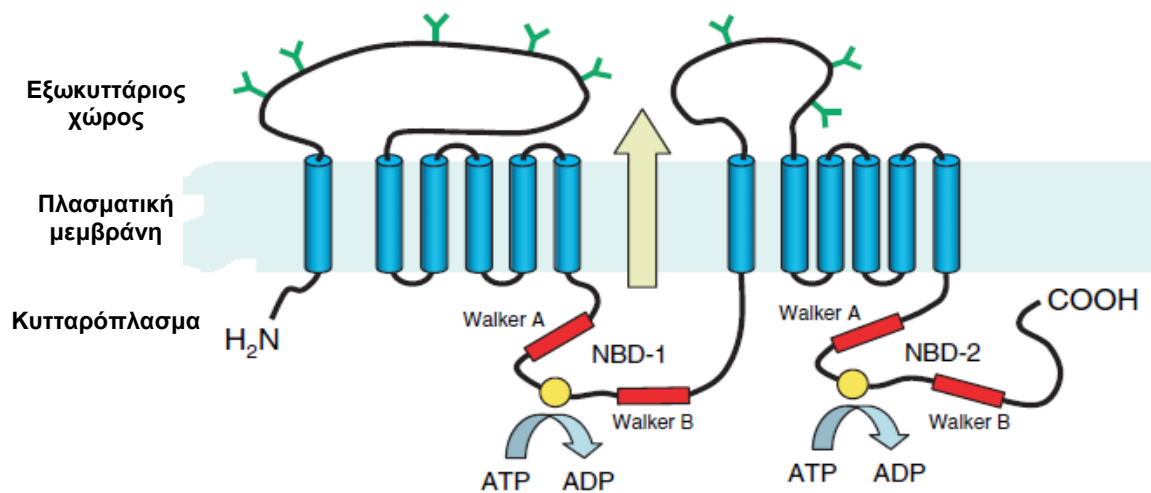
Συμπερασματικά, η μεγάλη ευελιξία και πλαστικότητα που χαρακτηρίζει το μόριο της αποΑ-I της επιτρέπει να σχηματίζει HDL σωματίδια, τα οποία διαφέρουν στο μέγεθος και τη σύσταση. Η κατανόηση των δομικών παραμέτρων σχηματισμού των HDL σωματιδίων μπορεί να παράσχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις και τις λειτουργίες της αποΑ-I και της HDL.

1.5 Οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταβολισμού της HDL

Στα πλαίσια του πολύπλευρου ρόλου της, η HDL ασκεί μια σειρά επιδράσεων σε διάφορους τύπους κυττάρων, οι οποίες θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ομοίωση της χοληστερόλης, τη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου, τη ρύθμιση έκκρισης φλεγμονωδών παραγόντων, καθώς και στην προστασία έναντι της καρδιαγγειακής νόσου (ΚΑΝ). Πολλές από αυτές τις λειτουργίες της HDL απαιτούν τη συμμετοχή της αποΑ-I ή αποδίδονται στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με μια πληθώρα παραγόντων. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, η λειτουργικότητα της αποΑ-I είναι συνυφασμένη με τη δομή της, η οποία της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με διάφορους μεταφορείς λιπιδίων και ένζυμα, οδηγώντας στον σχηματισμό HDL σωματιδίων που διαφέρουν στο μέγεθος και τη σύσταση. Παρακάτω περιγράφονται οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της HDL, καθώς και δομικές περιοχές της που φαίνεται ότι συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις αυτές.

1.5.1 Οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCA1

Το ανθρώπινο γονίδιο του ABCA1 έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 9q31 και αποτελείται από 50 εξώνια, τα οποία κωδικοποιούν 2261 αμινοξέα. Ο ABCA1 είναι μέλος της οικογένειας των ABC (ATP-binding cassette) μεταφορέων και αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες απαρτίζονται από 6 αμφιπαθείς α-έλικες η καθεμία, και δύο ενδοκυτταρικές περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD: Nucleotide Binding Domain). Κάθε περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου περιέχει δύο συντηρημένα πεπτιδικά μοτίβα, γνωστά ως Περιπατητής A (Walker A) και Περιπατητής B (Walker B), τα οποία είναι παρόντα σε όλους τους μεταφορείς της οικογένειας ABC, καθώς και σε πολλές πρωτεΐνες που δεσμεύουν ATP (Εικόνα 1.15). Επίσης, περιέχει έναν Περιπατητή C ή υπογραφή-μοτίβο (Walker C ή S, 5 αμινοξέα) που είναι μοναδικός σε κάθε ABC μεταφορέα^[101]. Ο ABCA1 έχει την N-τελική του πλευρά προσανατολισμένη προς το κυτοσόλιο και περιέχει δύο μεγάλους εξωκυτταρίους βρόγχους, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα γλυκοζυλιωμένοι και συνδέονται μέσω ενός ή περισσοτέρων δισουλφιδικών δεσμών^[102,103].



Εικόνα 1.15. Τοπολογικό μοντέλο του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1. Ο ABCA1 αποτελείται από δύο υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές, καθεμία αποτελούμενη από 6 α -έλικες (μπλε χρώμα) και δύο περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD-1 και NBD-2). Κάθε NBD χαρακτηρίζεται από τον Περπατητή A και τον Περπατητή B (Walker A and Walker B) (κόκκινο χρώμα) και μία μοναδική περιοχή (κίτρινο), όπου προσδένεται η ATP, ενώ τέλος περιέχει δυο μεγάλους εξωκυττάριους βρόγχους που είναι ισχυρά γλυκοζυλιωμένοι. (τροποποιημένη εικόνα από [104]).

Ο ABCA1 εκφράζεται ευρέως στο ήπαρ, τα μακροφάγα, τον εγκέφαλο και σε διάφορους άλλους ιστούς^[105,106]. Ο ABCA1 εντοπίζεται μόνο στη βασική επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, ενώ σε άλλους τύπους κυττάρων μπορεί να βρεθεί σε ενδοκυτταρικά κυστίδια συμπλεγμένος με την αποA-I και έχει δειχθεί ότι μετακινείται μεταξύ των ενδοκυτταρικών κυστιδίων και της επιφάνειας του κυττάρου^[107,108]. Μελέτες έχουν δείξει ότι στα μακροφάγα ο ABCA1 συμπλεγμένος με την αποA-I εσωτερικοποιείται, αλληλεπιδρά με ενδοκυτταρικές αποθήκες λιπιδίων και οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν στην επανέκκριση της αποA-I ως λιπιδιωμένο σωματίδιο^[109,110]. Επιπρόσθετα, μια αντίστοιχη πορεία που οδηγεί στη διακυττάρωση της αποA-I έχει περιγραφεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα^[111,112].

Ο ABCA1 επάγει την εκροή κυτταρικών φωσfolιπιδίων και χοληστερόλης στην ελεύθερη λιπιδίων ή ελάχιστα λιπιδιωμένη αποA-I, καθώς και σε άλλες απολιποπρωτεΐνες, οι οποίες επίσης περιέχουν δομικές επαναλήψεις 22- και 11-αμινοξικών καταλοίπων, αλλά όχι στα σφαιρικά HDL σωματίδια^[68,113]. Πειράματα εκροής λιπιδίων με συνθετικά πεπτίδια μήκους 18 αμινοξέων, τα οποία ήταν ανάλογα των αμφιπαθών α -ελίκων, έδειξαν ότι τα διμερή τους μιμούνται την αποA-I στην εκροή χοληστερόλης^[114-116]. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η αμφιπαθής α -έλικα είναι το κύριο δομικό μοτίβο για τη μεταφορά λιπιδίων μέσω του ABCA1^[7].

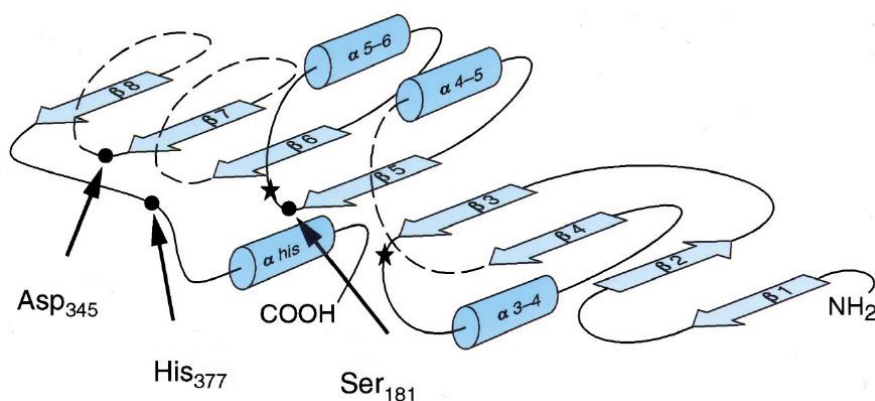
Οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τον ABCA1 οδηγούν στον σχηματισμό της δισκοειδούς HDL^[7]. Η λιπιδίωση της αποΑ-I μέσω της δράσης του ABCA1 λαμβάνει χώρα αρχικά κυρίως στο ήπαρ, ενώ οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τον ABCA1 στους περιφερικούς ιστούς οδηγούν στον εμπλουτισμό του σωματιδίου με χοληστερόλη και στην αύξηση της σταθερότητάς του^[117,118]. Μια σειρά πειραμάτων σε μοντέλα ζώων και κυτταρικές καλλιέργειες με μεταλλάξεις της αποΑ-I υποδεικνύουν ότι η C-τελική περιοχή της αποΑ-I που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 220-231 είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από τον ABCA1 εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων, καθώς η απαλοιφή της οδήγησε σε σημαντικά μειωμένη εκροή λιπιδίων^[119-122]. Επιπρόσθετα, μελέτες μεταφοράς γονιδίων, μέσω αδenoϊών, σε μυς που εξέφραζαν μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I στις περιοχές 218-222 και 225-230, αντίστοιχα, έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές οδηγούν στον σχηματισμό ελαττωματικών προ-β HDL σωματιδίων που αποτυγχάνουν να ωριμάσουν σε α-HDL σωματίδια^[123,124]. Εν αντιθέσει, μελέτες έχουν δείξει ότι η απαλοιφή του N-τελικού άκρου της αποΑ-I δεν επηρεάζει την ικανότητά της να επάγει την εκροή χοληστερόλης, μέσω του ABCA1^[121]. Περαιτέρω, έχειδειχθεί ότι μεταλλάξεις στον ABCA1, οι οποίες έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με τη νόσο της Τανγκέρης (Tangier disease), επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τον ABCA1, καθώς και την εκροή χοληστερόλης^[125,126]. Συνολικά, διαφαίνεται ότι ο σχηματισμός ενός παραγωγικού συμπλόκου της αποΑ-I και του ABCA1 απαιτεί όχι μόνο τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, αλλά και την αποτελεσματική λιπιδίωση της αποΑ-I από τον ABCA1^[120,127].

1.5.2 Οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με το ένζυμο LCAT

Η λιπιδίωση της αποΑ-I, μέσω του ABCA1, ακολουθείται από την αναδιοργάνωση της δισκοειδούς HDL, μια διαδικασία που περιλαμβάνει την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης από το ένζυμο LCAT.

Το γονίδιο της LCAT εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16q22 και αποτελείται από έξι εξώνια. Η LCAT συντίθεται και εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ και σε λιγότερο βαθμό από τον εγκέφαλο και τους όρχεις. Η ώριμη LCAT αποτελείται από 416 αμινοξικά κατάλοιπα με μοριακό βάρος 63 kDa, το οποίο είναι ~20% μεγαλύτερο από το προβλεπόμενο και αποδίδεται στη N- και O-γλυκοζυλίωση του ενζύμου^[128,129]. Σύμφωνα με ένα μερικό δομικό μοντέλο, το οποίο είναι βασισμένο στην ομολογία της LCAT με τις πρωτεΐνες της οικογένειας με δομή α/β

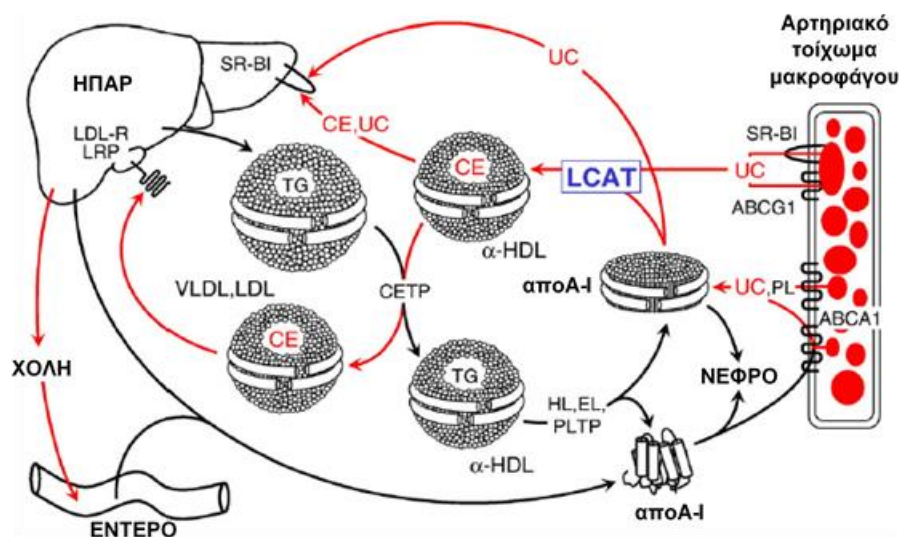
υδρολασών^[130], αλλά και με βάση δύο κρυσταλλικές δομές της LCAT, μίας μεταλλαγμένης μορφής της (Cys31Tyr)^[131] και μίας πολύ χαμηλής ανάλυσης δομή^[132], η κεντρική περιοχή του ενζύμου αποτελείται από επτά συντηρημένες έλικες με διαμόρφωση β-φύλλων, οι οποίες συνδέονται με τέσσερις α-έλικες και βρόγχους (Εικόνα 1.16). Το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου σχηματίζεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser181, Asp345, και His377^[131], ενώ τα κατάλοιπα Cys31 και Leu182 έχουν αναγνωρισθεί ως τα κατάλοιπα που σχηματίζουν έναν θύλακα οξυανιόντος^[133]. Επιπλέον, στην LCAT έχουν περιγραφεί δύο δισουλφιδικοί δεσμοί, οι οποίοι σχηματίζονται από τα κατάλοιπα Cys50-Cys74 και Cys313-Cys356^[133,134]. Ο δεσμός που σχηματίζουν τα κατάλοιπα Cys50-Cys74 εκτείνεται στην περιοχή επικάλυψης (lid region) της LCAT, η οποία καλύπτει την καταλυτική της περιοχή και ανοίγει όταν το ένζυμο προσδένεται στις επιφάνειες των λιποπρωτεϊνών^[135].



Εικόνα 1.16. Η κεντρική περιοχή της LCAT. Οι τελείες παριστάνουν τα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας, ενώ τα αστέρια άλλα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. (τροποποιημένη εικόνα από [130]).

Η καταλυόμενη εστεροποίηση της χοληστερόλης από την LCAT επιτρέπει τη μεταφορά ενός λιπαρού οξέος από τη φωσφατιδυλοχολίνη στην υδροξυλομάδα της χοληστερόλης^[39]. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε δύο βήματα^[136,137]. Κατά το πρώτο, η LCAT, μέσω της δραστηριότητάς της ως φωσφολιπάση A2, διασπά τον εστερικό δεσμό του λιπαρού οξέος στη θέση sn-2 της λεκιθίνης και το μεταφέρει στη Ser181. Εν συνεχεία, το λιπαρό οξύ μετεστεροποιείται στην ελεύθερη 3-β υδροξυλομάδα της χοληστερόλης, δημιουργώντας έτσι έναν χοληστερουλεστέρα (CE). Η LCAT προσδένεται στα HDL σωματίδια αντιστρεπτά και θεωρείται ότι η λιπιδωμένη apoA-I αποτελεί τον κύριο φυσιολογικό ενεργοποιητή του

ενζύμου^[39,135]. Τα μόρια CE που σχηματίζονται από τη δράση της LCAT πακετάρονται στον υδρόφοβο πυρήνα των σωματιδίων, εμποδίζοντας έτσι την αυθόρμητη ανταλλαγή της χοληστερόλης από την HDL στα κύτταρα. Η δράση του ενζύμου οδηγεί στη μετατροπή των δισκοειδών HDL σωματιδίων στα ώριμα σφαιρικά HDL σωματίδια, τα οποία έχουν αθηροπροστατευτικές ιδιότητες^[138,139]. Παράλληλα, υποστηρίζεται ότι η LCAT συμβάλλει στην εκροή χοληστερόλης, διατηρώντας την κλίση συγκέντρωσης της χοληστερόλης μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και των εξωκυτταρικών αποδεκτών, διευκολύνοντας έτσι την εκροή της, μέσω παθητικής διάχυσης ή μέσω του ABCG1^[140,141]. Επιπλέον, η εστεροποίηση της χοληστερόλης του πλάσματος ίσως απαιτείται πριν οι CE προσληφθούν από τα ηπατοκύτταρα, είτε άμεσα μέσω του SR-BI, είτε έμμεσα μέσω της δράσης της CETP^[142] (Εικόνα 1.17). Διαφάνεται, λοιπόν, ότι η LCAT διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση της HDL, αλλά και στην πορεία RCT.



Εικόνα 1.17. Ο ρόλος της LCAT στο μεταβολισμό της HDL. UC: μη εστεροποιημένη χοληστερόλη. (τροποποιημένη εικόνα από [143]).

Οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην ενεργοποίηση της LCAT από την apoA-I δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι τα κατάλοιπα Arg130 και Lys133 της apoA-I διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ενζύμου^[143]. Ειδικότερα, τα κατάλοιπα αυτά θεωρείται ότι εμπλέκονται στον σχηματισμό ενός αμφιπαθούς καναλιού, το οποίο επιτρέπει τη μετακίνηση των υδρόφοβων αλυσίδων των φωσφολιπιδίων και της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης από τη διπλοστιβάδα στο ενεργό κέντρο της LCAT^[144]. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει ότι η έλικα 6 της apoA-I (143-164αα)

είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της LCAT^[145-148]. Μελέτες φυσικά απαντώντων μεταλλάξεων της αποΑ-I που σχετίζονται με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου υποδεικνύουν ότι μια πιο εκτεταμένη περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 110-160 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου^[149]. Συνολικά, καταδεικνύεται ότι οι κεντρικές έλικες της αποΑ-I (4-6) εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της LCAT.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της LCAT σχετίζονται με δύο παθολογικούς φαινοτύπους στους ανθρώπους, την οικογενή έλλειψη της LCAT (familial LCAT deficiency, FLD) και τη νόσο «μάτι του ψαριού» (fish-eye disease, FED). Και οι δύο ασθένειες χαρακτηρίζονται από την ανικανότητα της LCAT να εστεροποιεί τη χοληστερόλη στην HDL ή/και την LDL^[44,150]. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η πλήρης ανεπάρκεια της LCAT σε ασθενείς ή μυσ οδηγεί στον σχηματισμό προ-β- και λίγων μικρών σε μέγεθος α-HDL σωματιδίων^[27].

1.5.3 Οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1

Τα σφαιρικά HDL σωματίδια που σχηματίζονται από τη δράση της LCAT αναδιοργανώνονται περαιτέρω μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1. Ο ABCG1 είναι μέλος της ίδιας υπεροικογένειας με τον ABCA1, αλλά ανήκει στους λεγόμενους ημι-μεταφορείς, καθώς αποτελείται μόνο από μία περιοχή δέσμευσης ATP στο N-τελικό του άκρο που ακολουθείται από μία διαμεμβρανική περιοχή. Για να είναι λειτουργικός ο ABCG1 απαιτείται να σχηματίζει ομο- ή ετεροδιμερή με μέλη της οικογένειας των ABCG μεταφορέων^[151].

Ο ABCG1 εκφράζεται στον σπλήνα, τον θύμο αδένα, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο^[15,152] και εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα^[153-155]. Έχει δειχθεί ότι η υπερэкφραση του ABCG1 επάγει την εκροή χοληστερόλης από διάφορους τύπους κυττάρων, όπως μακροφάγα, λιποκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, προς την HDL, αλλά όχι την ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I^[15,153]. Επίσης, μελέτες σε επίμυς με ανεπάρκεια του ABCG1 έδειξαν ότι ο μεταφορέας αυτός παίζει κρίσιμο ρόλο στην εκροή κυτταρικής χοληστερόλης. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ο ABCG1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της πορείας RCT από μακροφάγα *in vivo*. Παράλληλα έχει δειχθεί ότι ο ABCG1, πέραν της εκροής χοληστερόλης, προάγει την εκροή της 7-κετοχοληστερόλης και σχετιζόμενων οξυστερολών από μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα προς την HDL, προστατεύοντας τα κύτταρα από δυσλειτουργία και απόπτωση^[156,157].

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ABCG1 παρουσιάζει μικρή ή καμία εξειδίκευση ως προς τους αποδέκτες χοληστερόλης. Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη μελέτη υποδεικνύει ότι η C-τελική περιοχή της apoA-I που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 185-243 είναι ουσιώδης για την εξαρτώμενη από τον ABCG1 εκροή λιπιδίων^[158]. Αν και ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο ABCG1 διευκολύνει την εκροή στερολών παραμένει άγνωστος, έχει προταθεί ότι ο ABCG1 μεταφέρει τις στερόλες διαμέσου τη διπλοστιβάδας των ενδοσωμάτων πριν τη σύντηξή τους με την πλασματική μεμβράνη, αναδιανέμοντας έτσι τις στερόλες στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης και διευκολύνοντας την επακόλουθη εκροή προς την HDL ή άλλους αποδέκτες^[159]. Παρ' όλα αυτά, αρκετές μελέτες υποδεικνύουν τον παροδικό εντοπισμό του ABCG1 στην πλασματική μεμβράνη, που θα του επέτρεπε να αλληλεπιδρά με τους λιποπρωτεϊνικούς αποδέκτες^[121,158,160].

1.5.4 Οι αλληλεπιδράσεις της apoA-I με τον υποδοχέα της HDL SR-BI

Ο SR-BI είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 82 kDa και εκφράζεται στο ήπαρ, τους στεροειδογενείς ιστούς και τα ενδοθηλιακά κύτταρα^[161,162]. Η έκφραση του SR-BI στο ήπαρ έχει αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση των επιπέδων της HDL-C στο πλάσμα, ενώ η έκφρασή του στους στεροειδογενείς ιστούς είναι σημαντική για τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών. Ο SR-BI αποτελείται από μία εξωκυτταρική περιοχή, δύο διαμεμβρανικές περιοχές και δύο κυτταροπλασματικές N- και C-τελικές περιοχές^[161]. Έχει δειχθεί ότι ο υποδοχέας αυτός δεσμεύει μια ποικιλία προσδετών, συμπεριλαμβανομένων των LDL, VLDL, τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών και της λιπιδιωμένης apoA-I^[163,164]. Θεωρείται ότι η σημαντικότερη λειτουργία του είναι να δρα ως υποδοχέας της HDL.

Έχει δειχθεί ότι ο SR-BI δεσμεύει την HDL, καθώς και δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (reconstituted HDL, rHDL) που περιέχουν apoA-I ή apoE, μέσω τμημάτων των απολιποπρωτεϊνών αυτών^[165,166]. Η πρόσδεση της HDL στον SR-BI επάγει την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων από την HDL, καθώς και την αμφίδρομη ροή της ελεύθερης χοληστερόλης μεταξύ των κυττάρων και της HDL^[7,167]. Η επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης της HDL από τον ηπατικό SR-BI είναι πολύπλοκη διαδικασία και απαιτεί τη λειτουργία της πρωτεΐνης προσαρμογέα PDZK1 (PDZ domain containing 1). Η αλληλεπίδραση της PDZK1 με το C-τελικό άκρο του SR-BI έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει τη σταθερότητα και τον εντοπισμό του υποδοχέα^[168]. Αν

και ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος, έχει προταθεί ότι η δέσμευση της HDL στον SR-BI επιτρέπει στους εστέρες χοληστερόλης να εισέλθουν σε ένα κανάλι, το οποίο δημιουργείται από τον SR-BI και κινούνται κατά μήκος του προς την κυτταρική μεμβράνη, λόγω της διαφοράς συγκέντρωσης.

Η φυσιολογική σημασία των αλληλεπιδράσεων της HDL με τον SR-BI καταδεικνύεται από πλήθος *in vitro* και *in vivo* μελετών σε διαγονιδιακά μοντέλα μυών που υπερεκφράζουν ή έχουν ανεπάρκεια του SR-BI^[169,170]. Προσπάθειες για την αποσαφήνιση των μοριακών αλληλεπιδράσεων της HDL με τον SR-BI έχουν οδηγήσει στην παραγωγή μεταλλαγμένων μορφών του SR-BI με διαταραγμένη ικανότητα δέσμευσης της HDL^[171]. Παράλληλα, μελέτες εκροής χοληστερόλης με rHDL σωματίδια που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα στις έλικες 4 και 6 (102/103α και 160/162α, αντίστοιχα) της apoA-I μειώνουν σημαντικά την ικανότητά τους να επάγουν την εκροή χοληστερόλης^[7]. Τα ευρήματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί με μελέτες μεταφοράς γονιδίων, μέσω αδενοϊών, σε μυς με ανεπάρκεια της apoA-I^[172]. Συνολικά, διαφαίνεται ότι η αποτελεσματική εκροή χοληστερόλης μέσω του SR-BI απαιτεί όχι μόνο την άμεση πρόσδεση της HDL στον υποδοχέα, αλλά τον σχηματισμό ενός «παραγωγικού» συμπλόκου.

1.6 Φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις στην apoA-I

Αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν περιγραφεί περισσότερες από εξήντα μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο της apoA-I^[26]. Έχει διαπιστωθεί ότι μεταλλάξεις στην apoA-I αναστέλλουν διακριτά βήματα της πορείας βιογένεσης της HDL και είτε οδηγούν σε γρήγορο καταβολισμό ή σε συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων^[173]. Τουλάχιστον οι μισές από τις αναγνωρισμένες μεταλλάξεις στην apoA-I οφείλονται σε υποκατάσταση ενός και μόνο αμινοξέος και έχουν συσχετιστεί με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις HDL-C (υποαλφαλιποπρωτεϊναιμία), καθώς και με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πρόωρης αθηροσκλήρωσης^[43,174-178]. Ωστόσο, παρά τον παθολογικό φαινότυπο που παρουσιάζουν αυτές οι μεταλλάξεις, για την πλειονότητα των περιπτώσεων, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τη λειτουργικότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τρεις φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις στην apoA-I, οι Leu144Arg (L144R), Ala164Ser (A164S) και Leu178Pro (L178P),

οι οποίες έχουν αναγνωρισθεί από πληθυσμιακές μελέτες στον ισπανικό, δανέζικο και ολλανδικό πληθυσμό, αντίστοιχα και έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C στο πλάσμα^[176-178]. Αναλυτικότερα, ετεροζυγώτες ως προς τη μετάλλαξη L144R παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα HDL-C, σε σχέση με τα άτομα που εκφράζουν τη φυσιολογική αποΑ-I, χωρίς όμως να υπάρχουν κλινικά ευρήματα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης^[176]. Αντιθέτως, ετεροζυγώτες ως προς τη μετάλλαξη A164S έχουν φυσιολογικά επίπεδα HDL-C, αλλά παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας και εμφράγματος του μυοκαρδίου, καθώς και αυξημένη θνησιμότητα, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό^[177]. Η μετάλλαξη L178P έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα HDL-C και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρόωρης στεφανιαίας νόσου, ενώ ορισμένοι ετεροζυγώτες ως προς την αποΑ-I [L178P] χαρακτηρίζονται από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αύξηση του πάχους του αρτηριακού τοιχώματος^[178].

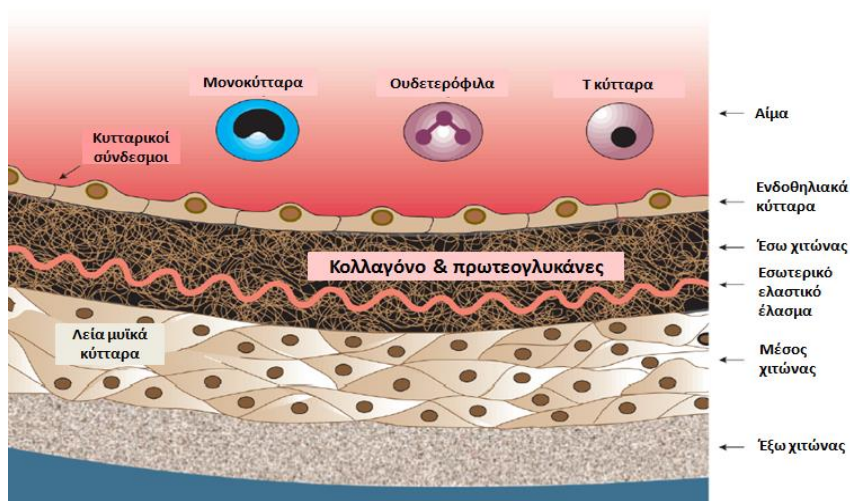
Παράλληλα, μελετήθηκε μια νέα φυσικά απαντώμενη μετάλλαξη στην αποΑ-I, η αποΑ-I[V19L], η οποία εντοπίστηκε πρόσφατα στον ισλανδικό πληθυσμό και αποτελεί τη μοναδική μετάλλαξη στην αποΑ-I που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HDL-C και μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου^[179].

1.7 Αθηροσκλήρωση

1.7.1 Η δομή της αρτηρίας

Μια υγιής αρτηρία αποτελείται από τρία ομόκεντρα στρώματα: το ενδότατο στρώμα που καλείται έσω χιτώνας, το μέσο στρώμα που καλείται μέσος χιτώνας και το εξωτερικό στρώμα που είναι γνωστό ως έξω χιτώνας. Ο έσω χιτώνας οριοθετείται από ένα ενιαίο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων που έρχεται σε επαφή με τον αυλό του αγγείου και εξωτερικά από το εσωτερικό ελαστικό έλασμα. Ο έσω χιτώνας αποτελείται από εξωκυττάριο συνδετικό ιστό θεμέλιας ουσίας, κυρίως πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο. Προχωρώντας προς τα έξω, ο μέσος χιτώνας αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα. Ανάλογα με το μέγεθος της αρτηρίας, υπάρχουν ένα ή περισσότερα στρώματα λείων μυϊκών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διατηρούνται σε συνοχή από μια εξωκυττάρια ύλη που αποτελείται κυρίως από ίνες ελαστίνης και κολλαγόνου, ενώ μπορούν επίσης να συνδέονται μεταξύ τους μέσω κυτταρικών συνδέσμων. Μετά το εξωτερικό ελαστικό έλασμα, υπάρχει ο έξω

χιτώνας που είναι το πιο ακραίο στρώμα της αρτηρίας. Ο έξω χιτώνας αποτελείται από μια χαλαρή ύλη με μικρό ποσό ινών ελαστικής, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες και κολλαγόνο^[180,181] (Εικόνα 1.18).



Εικόνα 1.18. Η δομή μιας μεγάλης φυσιολογικής αρτηρίας. (τροποποιημένη εικόνα από [181]).

1.7.2 Ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση είναι μία προοδευτική πάθηση των μεγάλων αρτηριών, η οποία χαρακτηρίζεται από πάχυνση του έσω χιτώνα της αρτηρίας, λόγω συσσώρευσης λιπιδίων και ινωδών στοιχείων, καθώς και στένωση του αυλού της αρτηρίας. Οι πρώιμες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις των αρτηριών συνίστανται από υποενδοθηλιακή συσσώρευση χοληστερόλης και διογκωμένων μακροφάγων, τα οποία καλούνται “αφρώδη κύτταρα”. Στους ανθρώπους, η αθηρωματική πλάκα μπορεί να βρεθεί στην αορτή την πρώτη δεκαετία της ζωής, στις στεφανιαίες αρτηρίες τη δεύτερη και στα αγγεία του εγκεφάλου την τρίτη ή τέταρτη δεκαετία^[180,181].

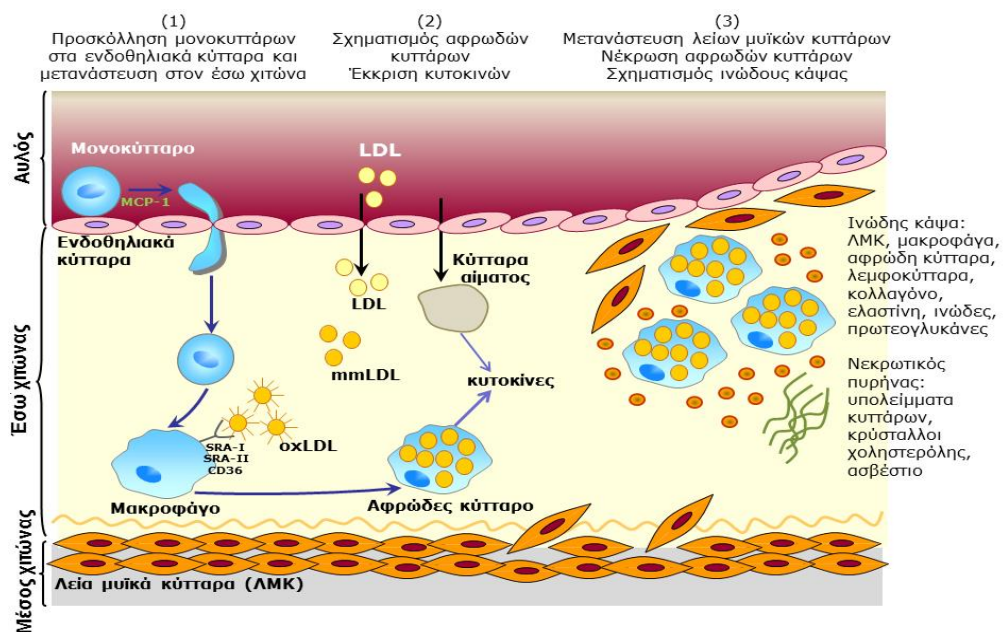
Η υποκείμενη παθολογία της νόσου χαρακτηρίζεται ως μία χρόνια, φλεγμονώδης διαδικασία των αρτηριακών τοιχωμάτων που συμβαίνει σε συγκεκριμένες περιοχές με διαταραχές στη ροή του αυλού των αρτηριών, όπως σε περιοχές διακλάδωσης. Το εναρκτήριο βήμα αυτής της διαδικασίας είναι η διατάραξη της ακεραιότητας του ενδοθηλίου και αλλαγές στη δομή του αγγείου, συμπεριλαμβανομένης της απουσίας σε κάποια σημεία της ελαστικότητας του στρώματος του αγγείου που περιβάλλει τον αυλό και έκθεση των πρωτεογλυκανών, που επιτρέπουν τη συσσώρευση των LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο (εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών). Τα υψηλά επίπεδα της

χοληστερόλης της κυκλοφορίας που μεταφέρεται από τις LDL, οι οποίες περιέχουν την apoB100, προάγουν την αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Η πρόσδεση της apoB100 στις αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας οδηγεί στη διατήρηση των LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου είναι επιδεκτικές στην οξειδωτική τροποποίηση από δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (reactive oxygen species, ROS) ή ένζυμα, όπως η μύελοπεροξειδάση (myeloperoxidase, MPO) ή οι λιποξιγενάσες που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα. Τα οξειδωμένα λιπίδια και οι οξειδωμένες LDL (oxidized LDL, oxLDL) οδηγούν στην έκφραση επιφανειακών μορίων προσκόλλησης (ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1, σελεκτίνη P, σελεκτίνη E και VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1) και την έκκριση χημειοτακτικών πρωτεϊνών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1), καθώς και αυξητικών παραγόντων, όπως ο διεγερτικός παράγοντας των αποικιών των μακροφάγων (monocyte-colony stimulating factor M-CSF), τα οποία μαζί με την εναπόθεση χυμοκινών προερχόμενων από τα αιμοπετάλια οδηγούν σε αυξημένη μετανάστευση των μονοκυττάρων, των T λεμφοκυττάρων και των NK (natural killers cells) κυττάρων από την κυκλοφορία στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος. Οι oxLDL επιδρούν επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναστέλλοντας την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO), έναν σημαντικό παράγοντα της αγγειοδιαστολής και αυξάνοντας την έκκριση αγγειοσυσταλτικών ουσιών, όπως η ενδοθηλίνη-1. Όταν τα μονοκύτταρα εισέλθουν στον έσω χιτώνα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και συσσωρεύουν oxLDL και κυτταρικά υπολείμματα μέσω των υποδοχέων «εκκαθαριστών» (scavengers), όπως οι SRA-I (scavenger receptor class A type I), SRA-II και CD36 που εκφράζουν. Αυτό αυξάνει τα εσωτερικά αποθέματά τους σε εστέρες χοληστερόλης, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε «αφρώδη κύτταρα». Τα ενεργοποιημένα αφρώδη κύτταρα ενισχύουν τη χημειοταξία των λεμφοκυττάρων, εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες. Στον άνθρωπο, αυτή η πρώιμη κάκωση του αγγείου χαρακτηρίζεται από τις κονδυλώδεις περιοχές απόθεσης λιπιδίων, οι οποίες μορφολογικά έχουν ονομαστεί «λιπαρές ραβδώσεις» (fatty streak lesions)^[180].

Η κάκωση του αγγείου που χαρακτηρίζεται από «λιπαρές ραβδώσεις» επιδεινώνεται με τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον έσω χιτώνα, όπου πολλαπλασιάζονται και συσσωρεύουν λιπίδια και κυτταρικά

υπολείμματα. Η μετανάστευση των κυττάρων αυτών διευκολύνεται από την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, στην οποία ενεργό ρόλο παίζουν οι καθεψίνες (πρωτεάσες σερίνης) σε συνδυασμό με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs). Η αγγειογένεση παρέχοντας οξυγόνο και θρεπτικά στα κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας συμβάλλει στην ανάπτυξη και τη σταθεροποίησή της. Οι πιο προχωρημένες και ασταθείς, ινώδεις, αθηρωματικές πλάκες στον έσω χιτώνα αποτελούνται από έναν πυρήνα πλούσιο σε νεκρωτικό υλικό και λιπίδια που περιβάλλεται από εξωκυττάρια υλικό και καλύπτεται από ινώδες κάλυμμα που περιέχει λεία μυϊκά κύτταρα. Οι πλάκες μπορούν να γίνουν ολοένα και πιο περίπλοκες, οπότε και ονομάζονται ώριμες, με ασβεστοποίηση των ινωδών περιοχών, εξέλκωση στην επιφάνεια του αυλού και αιμορραγία από μικρά αγγεία που αναπτύσσονται στην περιοχή της κάκωσης και προέρχονται από το μέσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος^[180,181].

Τα παραπάνω γεγονότα περιγράφουν την πορεία ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 1.19), κύρια επίπτωση της οποίας είναι η μείωση της αιματικής ροής των αρτηριών, η οποία προοδευτικά μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη απόφραξή τους. Πλήρης οξεία απόφραξη προκαλείται, ωστόσο, συνήθως λόγω θραύσης της πλάκας και σχηματισμού θρόμβου αίματος στη στενευμένη αθηροσκληρωτική αρτηρία, γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση σοβαρών κλινικών επιπλοκών, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το εγκεφαλικό επεισόδιο^[181].



Εικόνα 1.19. Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη γεγονότων που προάγουν το σχηματισμό αθηροσκληρωτικών πλάκων. mmLDL: μερικώς τροποποιημένη LDL.

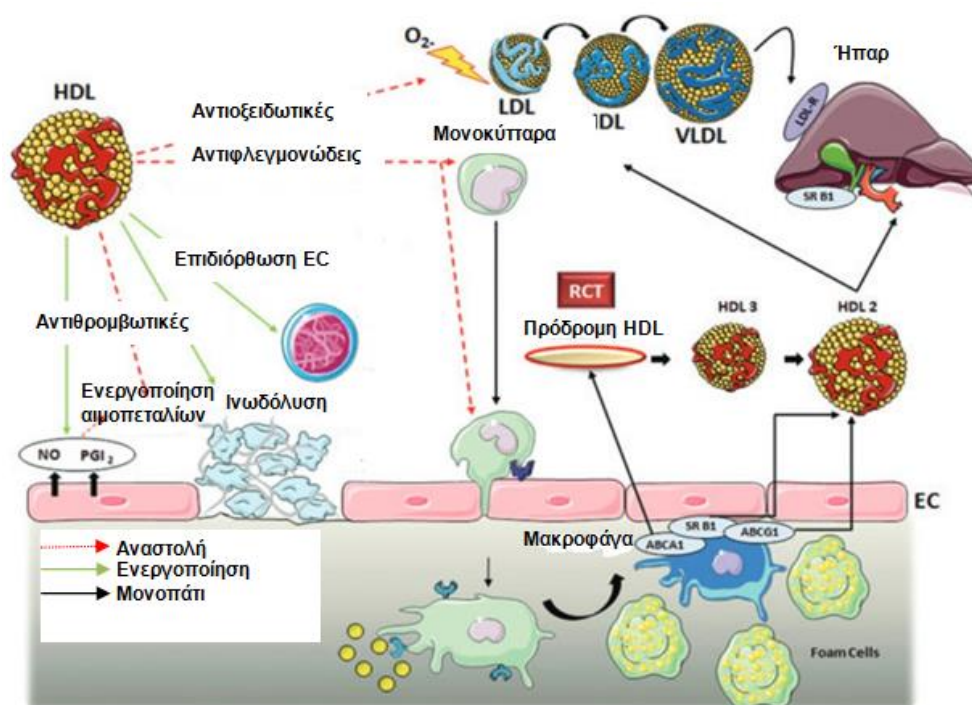
1.8 Οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL

Πολυάριθμες, επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα χαμηλά επίπεδα της HDL-C στο πλάσμα αντιπροσωπεύουν έναν ισχυρό και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την πρόωρη ανάπτυξη αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής νόσου σε ανθρώπους^[13,182,183]. Από αυτές τις μελέτες έχει υπολογιστεί ότι μία αύξηση των επιπέδων της HDL-C κατά 1 mg/dL ισοδυναμεί με μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου κατά 2% στους άντρες και 3% στις γυναίκες, αντίστοιχα^[184]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η σχέση μεταξύ των επιπέδων της HDL-C και του καρδιαγγειακού κινδύνου είναι πιο περίπλοκη και ότι τα επίπεδα της HDL-C από μόνα τους δε σχετίζονται απαραίτητα αιτιωδώς με τα αθηροσκληρωτικά καρδιαγγειακά επεισόδια^[185]. Εν αντιθέσει, πλήθος μελετών αναδεικνύει ότι οι πλειοτροπικές λειτουργίες της HDL και η συσχέτιση αυτών με τη σύσταση και τη δομή της είναι πιο συναφείς με την αθηροπροστασία^[186,187].

Όπως περιγράφηκε προηγούμενα, η HDL αποτελεί έναν ετερογενή πληθυσμό σωματιδίων που διαφέρουν σε μέγεθος, πυκνότητα, πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση. Πέραν της apoA-I και της apoA-II, που είναι οι κύριες πρωτεΐνες της HDL, η HDL περιέχει επίσης μια ποικιλία άλλων απολιποπρωτεϊνών (apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE, apoA-IV, apoF, apoH, apoJ, apoL και apoM) και πρωτεϊνών, εκατοντάδες διαφορετικά λιπίδια και μια σειρά μεταβολιτών (ορμόνες, βιταμίνες)^[31,188]. Πρωτεομικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η HDL φέρει πάνω από 85 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων λιπολυτικών/υδρολυτικών ενζύμων, όπως η LCAT, η παραοξονάση 1 (paraoxonase 1, PON1), η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet-activating factor acetyl hydrolase, PAF-AH) και η σεληνοπεροξειδάση της γλουταθειόνης (selenium-glutathione peroxidase, GSHPx), καθώς και πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, όπως η CETP^[31,189]. Μεταξύ των δράσεών τους, τα παραπάνω ένζυμα υποστηρίζεται ότι τροποποιούν δυνητικά αθηρογόνες ROS στην LDL, στα αγγειακά τοιχώματα, ακόμα και στην ίδια την HDL^[190]. Επιπλέον, φέρει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που θεωρείται ότι έχουν αντιφλεγμονώδεις και ανοσολογικές ιδιότητες^[191]. Περαιτέρω, λιπιδομικές αναλύσεις έχουν αναγνωρίσει μια ποικιλία λιπιδίων, όπως φωσφολιπίδια, τριγλυκερίδια, χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, φωσφατιδυλοχολίνη, κηραμίδια και άλλα^[192,193]. Ενώ τέλος, πρόσφατες μελέτες

έδειξαν ότι η HDL αποτελεί επίσης μεταφορέα microRNA προς κύτταρα αποδέκτες^[194].

Η HDL ασκεί μια σειρά αθηροπροστατευτικών δράσεων σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, οι οποίες περιλαμβάνουν την προαγωγή της πορείας RCT^[195], την αναστολή της οξειδωσης των LDL^[196], τη ρύθμιση της έκκρισης φλεγμονωδών παραγόντων στα αγγειακά κύτταρα^[197], αντιθρομβωτικές και αντιαθηρογόνες επιδράσεις στο ενδοθήλιο, όπως η διέγερση της παραγωγής NO, καθώς και την προαγωγή μηχανισμών επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου^[198] (Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20. Οι πλειοτροπικές αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL. PGI₂: προσταγλανδίνη I₂, EC: ενδοθηλιακά κύτταρα. (τροποποιημένη εικόνα από [199]).

1.8.1 Η πορεία ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης (RCT)

Η συσσώρευση της χοληστερόλης στα μακροφάγα αποτελεί κύριο γνώρισμα της αθηρογένεσης. Αν και η εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα έχει μικρή συμβολή στη βιογένεση της HDL και στην ολική χοληστερόλη που μεταφέρεται από την HDL, θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης της χοληστερόλης των μακροφάγων και την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Έχει προταθεί ότι η ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα είναι καταλληλότερος προγνωστικός δείκτης μελλοντικών καρδιαγγειακών επεισοδίων, σε σχέση με τα επίπεδα της HDL-C^[195]. Η πορεία

RCT περιλαμβάνει την απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα αφρώδη μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών μέσω της HDL και τη μεταφορά της στο ήπαρ προς απέκκριση στη χολή^[14]. Η ικανότητα της apoA-I και της HDL να επάγουν αυτήν την πορεία θεωρείται ότι εμποδίζει τον σχηματισμό ή υποστρέφει τον ήδη σχηματισμένο νεκρωτικό πυρήνα των αθηρωματικών πλακών^[199].

Έχουν περιγραφεί αρκετές πορείες με τις οποίες η HDL οδηγεί στην εκροή της κυτταρικής χοληστερόλης^[200]. Σύμφωνα με μια πορεία, η χοληστερόλη μπορεί να μεταφερθεί από τα κύτταρα στην HDL μέσω παθητικής διάχυσης, λόγω της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης της χοληστερόλης μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και της HDL^[200]. Οι άλλες πορείες περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις της apoA-I και της HDL με συγκεκριμένους μεταφορείς λιπιδίων και υποδοχέων. Η ελεύθερη λιπιδίων ή ελάχιστα λιπιδιωμένα apoA-I επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του ABCA1, οδηγώντας στη σταδιακή λιπιδίωση της apoA-I, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των πρόδρομων HDL σωματιδίων. Τα ώριμα HDL σωματίδια που σχηματίζονται από τη δράση της LCAT μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1 ή με τον υποδοχέα της HDL SR-BI. Ο SR-BI διευκολύνει την αμφίδρομη ροή της ελεύθερης χοληστερόλης μεταξύ των κυττάρων και της HDL. Ακολούθως, η HDL μεταφέρει την περίσσεια χοληστερόλης προς το ήπαρ μέσω της δράσης του ηπατικού SR-BI^[195] ή μέσω της συνδυασμένης δράσης της CETP και του LDLr^[201] ή μέσω ενδοκύττωσης του σωματιδίου της^[202]. Τελικά, η χοληστερόλη απεκκρίνεται από το ήπαρ προς τη χολή είτε άμεσα ή μετά τη μετατροπή της σε χολικά οξέα^[203].

1.8.2 Οι προστατευτικές επιδράσεις της HDL στο ενδοθήλιο

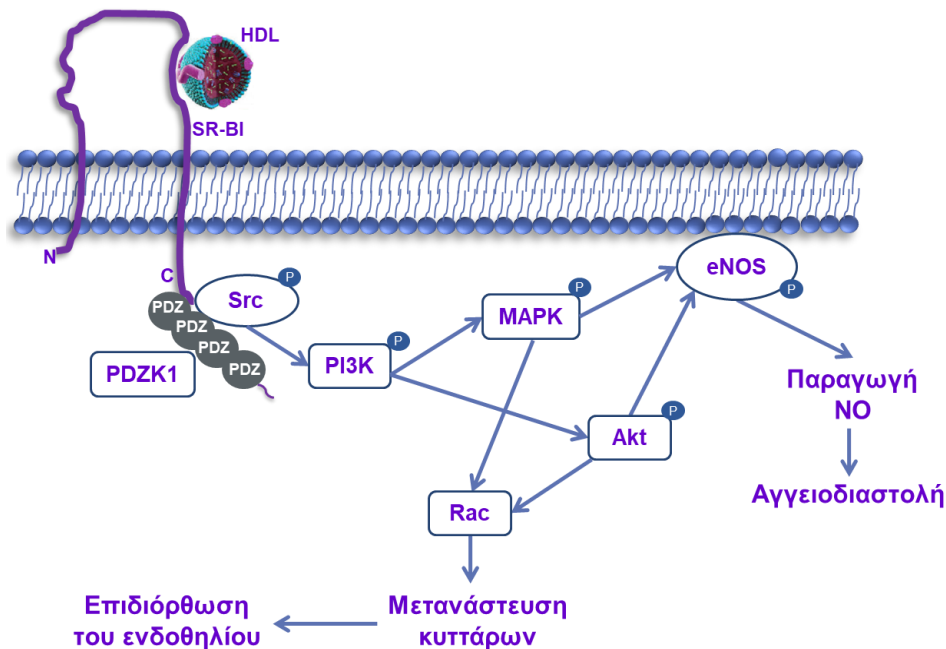
Οι μεταβολές στις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης διαθεσιμότητας ενδοθηλιακού NO, καθώς και η διατάραξη της ακεραιότητας του ενδοθηλίου αποτελούν χαρακτηριστικό των πρώτων σταδίων ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης^[204]. Η HDL ασκεί μια σειρά αντιαθηρογόνων επιδράσεων στο ενδοθήλιο, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της αγγειοδιαστολής, της αναστολής της απόπτωσης, καθώς και της προαγωγής μηχανισμών επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου^[198].

Πλήθος μελετών έχει εδραιώσει τον ρόλο της HDL ως ενδοθηλιακό αγγειοδιασταλτικό παράγοντα. Έχει δειχθεί ότι η HDL επάγει την εξαρτώμενη από

το NO αγγειοδιαστολή σε δακτυλίους αρτηής μυών *ex vivo*, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο^[205]. Η χορήγηση rHDL σωματιδίων σε ανθρώπους με υπερχοληστερολαιμία ή χαμηλά επίπεδα HDL-C (ετεροζυγώτες ως προς τον μεταφορέα ABCA1) επανάφερε σε φυσιολογικά επίπεδα την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο, επαγόμενη από το NO, αγγειοδιαστολή^[206]. Οι αγγειοπροστατευτικές επιδράσεις της HDL στο ενδοθήλιο μεσολαβώνται μέσω των αλληλεπιδράσεων της με τον SR-BI ή μέσω των υποδοχέων της 1-φωσφορικής σφινγγοσίνης (sphingosine-1-phosphate receptors, S1PRs), οι οποίες διεγείρουν οδούς σηματοδότησης που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) και την απελευθέρωση του NO^[207-209]. Αναλυτικότερα, η πρόσδεση της HDL στον SR-BI (Εικόνα 1.21) ή τον S1P3 επάγει τη φωσφορυλίωση της PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase, κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης), η οποία καθοδικά ενεργοποιεί τις κινάσες Akt (protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση B) και MAPK (mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο) που ανεξάρτητα φωσφορυλιώνουν την eNOS στη Ser1177, η οποία ενεργοποιεί την παραγωγή του NO^[209,210]. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η εκροή της 7-κετοχοληστερόλης μέσω του ABCG1 διευκολύνει την ενεργοποίηση της eNOS από την HDL. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, η συσσώρευση της 7-κετοχοληστερόλης σε ενδοθηλιακά κύτταρα επιμύων με ανεπάρκεια ABCA1 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των ανασταλτικών επιδράσεων της eNOS με την καβεολίνη-1 και τη μείωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής. Το αποτέλεσμα αυτό ανεστράφη από την HDL με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τον ABCG1^[211].

Άλλες ευεργετικές επιδράσεις της HDL στο αγγειακό σύστημα είναι η αναστολή της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι αντιαποπτωτικές ιδιότητες της HDL υποστηρίζονται από αρκετές *in vitro* μελέτες. Η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με την HDL οδήγησε στη μείωση της επαγόμενης από την oxLDL ή τον TNF-α (anti-tumor necrosis factor-α, παράγοντας νέκρωσης όγκου-α) απόπτωσης^[212,213]. Αν και ο μηχανισμός δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, έχει προταθεί ότι η HDL συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων, αναστέλλοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c^[214]. Επιπρόσθετα, οι αντιαποπτωτικές ιδιότητες της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν αποδοθεί στην αποA-I και περιλαμβάνουν την επαγωγή της οδού σηματοδότησης PI3K/Akt/eNOS^[213].

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, η διατάραξη της ακεραιότητας του ενδοθηλίου μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL επιταχύνει την επανα-ενδοθηλιοποίηση μετά από αγγειακό τραυματισμό. Η ηπατική έκφραση της ανθρώπινης apoA-I βελτίωσε τη διαταραγμένη επανα-ενδοθηλιοποίηση καρωτίδων αρτηριών μετά από πειριαγγειακό τραυματισμό σε μυσ με ανεπάρκεια της apoA-I^[215]. Επιπλέον, πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι η HDL συμβάλλει στην επιδιόρθωση του ενδοθηλίου μετά από τραυματισμό, επάγοντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων^[215]. Έχει προταθεί πως η πρόσδεση της HDL στον ενδοθηλιακό SR-BI ενεργοποιεί τη διαδοχική οδό σηματοδότησης των κινασών Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase, κινάση του σαρκώματος)/PI3K/Akt που καταλήγει καθοδικά στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Rac GTPases, οι οποίες επάγουν το σχηματισμό ελασματοποδίων (lamellipodia), διεγείροντας τελικά τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων^[198,216]. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση αυτών των οδών σηματοδότησης από την HDL μέσω της πρόσδεσής της στον SR-BI απαιτούν τη δράση της πρωτεΐνης προσαρμογέα PDZK1^[217] (Εικόνα 1.21).



Εικόνα 1.21. Επαγωγή μηχανισμών επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου μέσω της πρόσδεσης της HDL στον υποδοχέα της SR-BI. Η πρόσδεση της HDL στον ενδοθηλιακό SR-BI ενεργοποιεί καθοδικά τις κινάσες Src, PI3K, Akt και MAPK. Ο καταρράκτης αυτών των γεγονότων οδηγεί καθοδικά στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Rac GTPases, οι οποίες επάγουν τον σχηματισμό ελασματοποδίων, διεγείροντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και την

ενεργοποίηση της eNOS, η οποία επάγει την παραγωγή του αγγειοδιασταλτικού NO. (τροποποιημένη εικόνα από [215]).

1.8.3 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL

Η οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη, κυρίως της LDL και η διατήρηση αυτών στο αρτηριακό τοίχωμα θεωρείται ότι αποτελεί ένα από τα αρχικά βήματα της αθηρογένεσης^[181]. Πολυάριθμες μελέτες υποδεικνύουν ότι η HDL περιορίζει την αθηρογόνο δράση των LDL του υποενδοθηλιακού χώρου, αναστέλλοντας τη συσσώρευση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων (lipid hydroperoxides, LOOH) στην επιφάνειά τους^[218]. Η μεταφορά των LOOH από την LDL στην HDL μπορεί να γίνει είτε άμεσα μέσω της στιβάδας των φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών ή έμμεσα μέσω της δράσης της CETP. Ακολούθως, η HDL απενεργοποιεί τα LOOH, ανάγοντάς τα στα αντίστοιχα υδροξείδιά τους^[218,219]. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL έχουν αποδοθεί κυρίως στην αποΑ-I. Έχει δειχθεί ότι τα κατάλοιπα Met112 και Met148 της αποΑ-I ανάγουν τα LOOH στα υδροξείδια των λιπιδίων τους, τερματίζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων^[218,219]. Μεταγενέστερα, τα LOOH απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω των αλληλεπιδράσεων της HDL με τον ηπατικό SR-BI.

Πέραν της αποΑ-I, αρκετά ένζυμα και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την HDL συμβάλλουν στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Δύο τέτοια ένζυμα αποτελούν η PON1 και η PAF-AH. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η PON1 μπορεί να αναστείλει τη δραστηριότητα της ελαφρώς oxLDL και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (oxPL), υποδηλώνοντας ότι η PON1 μπορεί να υδρολύσει τα oxPL^[220,221]. Επίσης, πειράματα σε διαγονιδιακά μοντέλα ζώων με ανεπάρκεια ή υπερέκφραση της PON1 υποδεικνύουν ότι είναι πιο επιρρεπή ή λιγότερο επιρρεπή στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών, αντίστοιχα^[197]. Περαιτέρω, έχει δειχθεί ότι η δράση της PON1 μπορεί έμμεσα να μειώσει την προφλεγμονώδη σηματοδότηση στα κύτταρα *in vivo* και να συνεισφέρει στις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL^[222,223]. Η PAF-AH διαδραματίζει καίριο ρόλο στην αποικοδόμηση προφλεγμονωδών λιπιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, υδρολύοντας τον PAF, έναν ισχυρό μεσολαβητή της φλεγμονής, καθώς και oxPL παρόμοια του PAF, παράγοντας λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysophosphatidylcholine, lysoPC) και οξειδωμένα λιπαρά οξέα^[224]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η HDL μυός που περιέχει

την ανθρώπινη PAF-AH αναστέλλει τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και διευκολύνει την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα^[225].

Τέλος, αρκετές μελέτες υποδηλώνουν ότι η LCAT συμβάλλει στην αναστολή της οξειδωσης της LDL. Η LCAT, με τη δραστικότητα φωσφολιπάσης A2 (PLA2), μπορεί να υδρολύσει οξειδωμένες ακυλαλυσίδες φωσφατιδυλοχολινών (oxPC), παράγοντας τη λιγότερο βιοδραστική lysoPC και οξειδωμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν από την LCAT για να εστεροποιήσει τη διακυλογλυκερόλη, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο τριγλυκερίδια, εκτός από τον σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης^[226]. Μελέτες έδειξαν ότι η επώαση της LDL με την LCAT εμπόδισε τον επαγόμενο από τον Cu²⁺ σχηματισμό LOOH στην LDL^[227]. Επιπρόσθετα, μελέτες μεταφοράς γονιδίων, μέσω αδενοϊών, σε μυς που εξέφραζαν το γονίδιο της ανθρώπινης LCAT οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων έναντι της oxLDL^[228].

1.8.4 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL

Ένα αρχικό γεγονός της παθογένεσης της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνει την αύξηση της έκκρισης μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, οδηγώντας στη διήθηση των μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο. Η διαδικασία αυτή προκαλεί αγγειακή φλεγμονή, η οποία είναι από τις κύριες αιτίες που οδηγούν στον σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών.

Αρκετές μελέτες αναδεικνύουν ότι η σφαιρική HDL εμποδίζει την έκφραση των προφλεγμονωδών μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1 και διεγείρει την έκφραση του αντιφλεγμονώδους παράγοντα TGF₂ (transforming growth factor β₂, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β₂) στα ενδοθηλιακά κύτταρα^[197]. Έχει δειχθεί ότι η καταστολή της ενδοθηλιακής φλεγμονής από την HDL επάγεται από την πρόσδεση της λιποπρωτεΐνης στον SR-BI, η οποία οδηγεί καθοδικά στην ενεργοποίηση των PI3K/Akt και ακολούθως στην αύξηση των επιπέδων της οξυγενάσης της αίμης-1^[229,230]. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η HDL μπορεί να επηρεάζει την έκφραση του VCAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της εξαρτώμενης από τους SR-BI και S1P1 ενεργοποίησης των PI3K και eNOS^[230,231]. Παράλληλα, μελέτες υποστηρίζουν ότι αναστέλλει την προφλεγμονώδη δράση της CRP (C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) και την παραγωγή προφλεγμονωδών προσταγλανδινών από τα μονοκύτταρα, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζει τις προφλεγμονώδεις επιδράσεις της oxLDL στο ενδοθήλιο. Περαιτέρω,

έχει δειχθεί ότι περιορίζει την παραγωγή του χημειοτακτικού παράγοντα μονοκυττάρων (MCP-1) που επάγεται από την LDL^[197,232]. Αν και οι μηχανισμοί που η HDL εκφέρει τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της δεν είναι πλήρως γνωστοί, έχει υπονοηθεί ότι μπορεί να μεσολαβώνται από τη διαταραχή της σύστασης των σχεδίων λιπιδίων (“lipid rafts”) της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, δηλαδή περιοχών της πλασματικής μεμβράνης με υψηλά επίπεδα σε χοληστερόλη και σφιγγομυελίνη, μέσω της εξαρτώμενης εκροής κυτταρικής χοληστερόλης από τους μεταφορείς λιπιδίων ABCA1 και ABCG1. Η μείωση της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη των σχεδίων λιπιδίων οδηγεί σε τροποποίηση της δομής τους, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας σηματοδοτικές πορείες που σχετίζονται με αυτές^[232].

1.8.5 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL

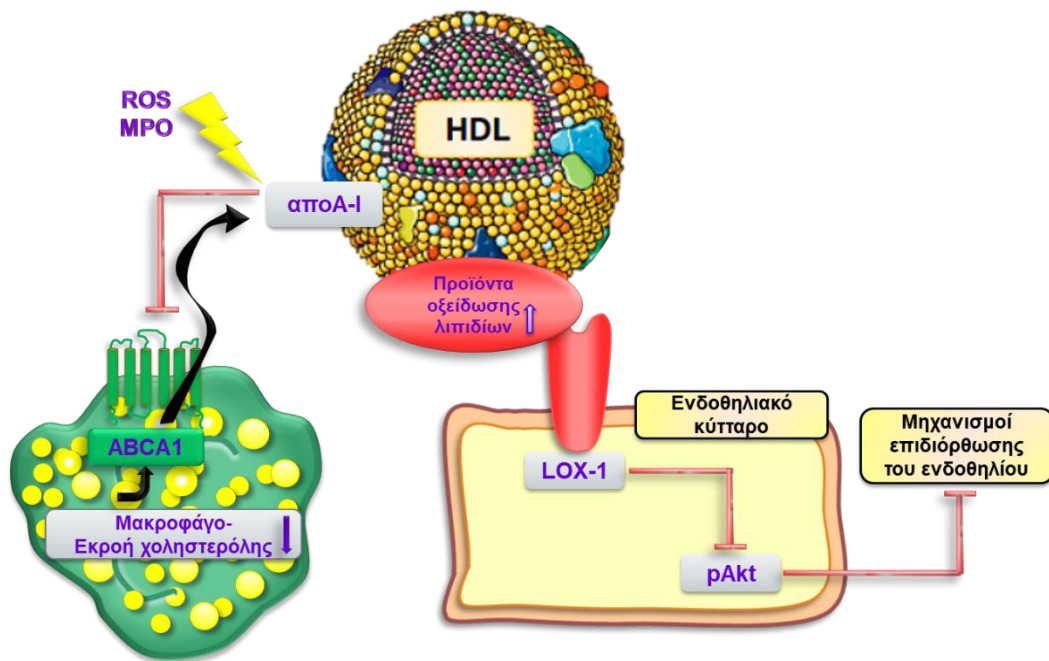
Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός θρόμβου συμβάλλουν άμεσα στην παθογένεση και τις επιπλοκές της καρδιαγγειακής νόσου. Έχει προταθεί ότι υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της HDL και του κινδύνου φλεβικής θρόμβωσης. Σε συμφωνία με την παρατήρηση αυτή, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τον ανασταλτικό ρόλο της HDL στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων^[233].

Έχει δειχθεί ότι η χορήγηση rHDL σωματιδίων σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II ανέστειλε τη συσσωμάτωση των αιματοπεταλίων, μειώνοντας το περιεχόμενο ποσοστό χοληστερόλης των μεμβρανών τους^[234]. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι η χορήγηση της αποA-Imilano (Arg173Cys) σε επίμυς με οξεία αρτηριακή θρόμβωση καθυστερεί τον σχηματισμό του θρόμβου και μειώνει τον όγκο του^[235]. Περαιτέρω, μελέτες υποδηλώνουν ότι η HDL2 μειώνει την επαγόμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση αιμοπεταλίων, απελευθερώνει την έκκριση 14C-σεροτονίνης, ADP και επινεφρίνης,^[236] εμποδίζει την παραμόρφωση του σχήματος των αιμοπεταλίων, καθώς και την κινητοποίηση του Ca²⁺^[237]. Έχει προταθεί ότι η αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από την HDL επάγεται από την πρόσδεσή της στον SR-BI, η οποία καθοδικά οδηγεί στην ενεργοποίηση της eNOS^[238]. Στο ίδιο πλαίσιο έχει δειχθεί ότι οι αντιθρομβωτικές επιδράσεις της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα μεσολαβώνται από τις αλληλεπιδράσεις της HDL με τον SR-BI, οι οποίες διεγείρουν την οδό σηματοδότησης PI3K/Akt/eNOS και περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της κυκλοοξυγενάσης-2 (cyclooxygenase-2,

Cox-2) και την αύξηση της παραγωγής της προσταγλανδίνης I₂ (PGI₂)^[239], έναν ισχυρό μεσολαβητή της θρομβοαντίστασης. Επιπρόσθετα, οι αντιπηκτικές και ινωδολυτικές ιδιότητες της HDL έχουν ευρέως περιγραφεί σε πολλές *in vitro* μελέτες. Έχει δειχθεί ότι η HDL ενισχύει σημαντικά την απενεργοποίηση του παράγοντα πήξης Va, μέσω ενεργοποίησης των πρωτεϊνών C και S^[240].

1.9 Δυσλειτουργική HDL

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι τα επίπεδα της HDL-C σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ^[13,182]. Ωστόσο, κλινικές δοκιμές φαρμάκων που είχαν ως στόχο την αύξηση των επιπέδων της HDL-C δεν κατάφεραν να μειώσουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ασθενείς με προϋπάρχουσα στεφανιαία νόσο (CAD)^[241]. Επιπλέον, μελέτες μεντελικής τυχαίοποίησης κατέδειξαν ότι οι γενετικοί μηχανισμοί που αυξάνουν την HDL του πλάσματος δε φαίνεται να μειώνουν τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου^[242]. Παράλληλα, έχει καταστεί σαφές ότι σε καταστάσεις οξείας ή χρόνιας φλεγμονής επάγονται σημαντικές μεταβολές αμφότερα στα επίπεδα και τη λειτουργικότητα της HDL. Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει την απώλεια των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL ή ακόμα και τη μετατροπή της σε προ-αθηρογόνο^[243]. Δυσλειτουργική HDL, που παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα να επάγει την εκροή χοληστερόλης και να αναστέλλει την οξειδωση της LDL, έχει απομονωθεί από ασθενείς με στεφανιαία νόσο, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 2, μεταβολικά σύνδρομα, χρόνια νεφρική νόσο, καθώς και από ασθενείς με αυτοάνοσες παθήσεις^[206,244,245]. Επιπρόσθετα, σε πολλές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις της HDL με τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθίστανται αναποτελεσματικές^[213,246]. Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι η HDL ασθενών με στεφανιαία νόσο ή οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (acute coronary syndrome, ACS) αποτυγχάνει να επάγει μηχανισμούς που συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου, καθώς και να διεγείρει την παραγωγή NO, λόγω της ενεργοποίησης του ενδοθηλιακού υποδοχέα οξειδωμένων λιπιδίων LOX-1 (lectin-type oxidized LDL receptor 1), ο οποίος αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt^[206] (Εικόνα 1.22).



Εικόνα 1.22. Σχηματική αναπαράσταση της διαταραχής των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL. (τροποποιημένη εικόνα από [247]).

Οι μοριακές αλλαγές που συντελούν στη δυσλειτουργία της HDL πιθανότατα να οφείλονται σε αλλαγές της πρωτεομικής και λιπιδικής σύστασης της λιποπρωτεΐνης ή σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των σχετιζόμενων με την HDL πρωτεϊνών^[243]. Η απόκριση οξείας φάσης που συμβαίνει σε φλεγμονώδεις καταστάσεις επηρεάζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών και οδηγεί σε μη φυσιολογικό λιπιδικό προφίλ. Επιπλέον, κατά την απόκριση οξείας φάσης, η apoA-I στην HDL αντικαθίσταται από το αμυλοειδές A του ορού (serum amyloid A, SAA), τη χαλκοπλασμίνη και την απτογλοβίνη, μετατρέποντας την HDL σε προφλεγμονώδες μόριο^[247,248]. Έχει επίσης δειχθεί ότι το SAA επηρεάζει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα, καθώς και την αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL, αντικαθιστώντας την PON1 και την PAF-AH^[249]. Περαιτέρω, μελέτες υποδεικνύουν ότι η απόκριση οξείας φάσης και το SAA αυξάνουν την πρόσδεση της HDL στις πρωτεογλυκάνες του έσω χιτώνα του ενδοθηλίου και την καθιστούν επιρρεπή σε οξειδωτικές τροποποιήσεις^[250]. Έχει δειχθεί ότι η οξείδωση της apoA-I από τη μυελουπεροξειδάση (MPO) οδηγεί στον σχηματισμό δυσλειτουργικών HDL σωματιδίων^[251-253]. Η MPO είναι μια αιμοπρωτεΐνη που εκφράζεται από τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα και απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αποκοκκίωσης (degranulation)^[252]. Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξειδωτική χλωρίωση και νιτριλίωση των ελεύθερων υδροξυλικών ομάδων των καταλοίπων

τυροσίνης (Tyr) και θρυπτοφάνης (Trp), τη σουλφοξειδωση των καταλοιπων μεθειονίνης (Met) και την καρβαμυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων^[251,252]. Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι η MPO καταλύει την τοποειδική οξειδωση της αποΑ-I στα κατάλοιπα της Tyr και Met στις θέσεις 192 και 148, αντίστοιχα^[254,255]. Αυξημένη έκφραση MPO, καθώς και αυξημένα επίπεδα καρβαμυλιωμένης HDL έχουν βρεθεί σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες^[255,256]. Παράλληλα, υψηλά επίπεδα MPO σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας ή επανεμφάνισης ισχαιμικών επεισοδίων^[251,256]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδωση της αποΑ-I επηρεάζει την ικανότητα της HDL να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω του ABCA1, καθώς και να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT^[254,256]. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η HDL που έχει υποστεί οξειδωση από την MPO παρουσιάζει μειωμένη αντιφλεγμονώδη δράση^[256]. Περαιτέρω, η αποΑ-I μπορεί να υποστεί πρωτεολυτική διάσπαση από τις MMPs της θεμέλιας ουσίας, την πλασμίνη, την καλλικρεΐνη και τη χυμάση των ιστιοκυττάρων, οδηγώντας σε μειωμένη εκροή κυτταρικής χοληστερόλης^[257-259]. Συμπερασματικά, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υπόκειται η αποΑ-I φαίνεται να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο αμφότερα στον σχηματισμό προφλεγμονωδών σωματιδίων και την αθηρογένεση.

1.10 Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα

Τα χρόνια, αυτοάνοσα, ρευματικά νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) και η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ) έχουν συσχετιστεί με αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα και συχνά οι ασθενείς παρουσιάζουν αλλοιωμένο λιπιδικό προφίλ^[260,261]. Σε ασθενείς με ΣΕΛ, ΡΑ και ΑΣ έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα HDL-C και μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου PON1 στο πλάσμα^[262,263]. Επιπλέον, σε ασθενείς με ΡΑ και ΣΕΛ έχει διαπιστωθεί ότι μεταβάλλονται οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL^[263,264]. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η HDL ασθενών με ΡΑ και ΣΕΛ παρουσιάζει μειωμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη ικανότητα, καθώς και μειωμένη ικανότητα εκροής κυτταρικής χοληστερόλης^[265,266]. Τα γεγονότα αυτά αντανakλούν έναν προφλεγμονώδη φαινότυπο της HDL. Εν αντιθέσει, δεν υπάρχουν διαθέσιμες, αρκετές πληροφορίες για τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL ασθενών με ΑΣ, παρά το γεγονός

ότι η ΚΑΝ αποτελεί την πρωταρχική αιτία θανάτου στους ασθενείς αυτούς^[267,268]. Η διαταραχή των αντιαθηρογόνων ιδιοτήτων της HDL έχει μελετηθεί ως ένας μηχανισμός που οδηγεί σε αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο για τη ΡΑ και το ΣΕΛ^[263-266]. Επίσης, ομοίως με την ΑΣ, τόσο η ΡΑ, όσο και ο ΣΕΛ έχουν σχετιστεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο^[269]. Ωστόσο, η προέκταση αυτών των συμπερασμάτων στην ΑΣ θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, λόγω των διαφορών της παθολογίας της ΑΣ, συγκριτικά με τη ΡΑ και το ΣΕΛ. Σε αντίθεση με την ΑΣ, η ΡΑ και ο ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών αυτοαντισωμάτων που μπορεί να προκαλούν συστηματική φλεγμονή^[266,267]. Αυτή η παθολογία είναι απύσασα σε ασθενείς με ΑΣ^[270,271].

Η ΑΣ είναι χρόνια, φλεγμονώδης νόσος, η οποία κατά κύρια λόγο προσβάλλει τις ιερολαγόνιες αρθρώσεις και τον αξονικό σκελετό και ενδέχεται να συνοδεύεται από προσβολή των περιφερικών αρθρώσεων, καθώς και από πλήθος εξωαρθρικών βλαβών, συμπεριλαμβανομένων, της καρδιάς, των πνευμόνων και των οφθαλμών^[272-274]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου είναι η τοπικά αυξημένη παραγωγή νέου οστού, η οποία αρχίζει από το περίοστεο και οδηγεί στον σχηματισμό συνδεσμοφύτων (κάθετες οστέινες δοκίδες μεταξύ των παρυφών των σπονδύλων) που δύνανται να επεκταθούν σε ολόκληρη τη σπονδυλική στήλη, καταλήγοντας σε αγκύλωση (“bamboo spine”)^[275]. Αν και η παθογένεια της νόσου δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, διαφαίνεται ότι γενετικοί και ανοσολογικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου. Η ΑΣ έχει συσχετιστεί με το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης Ι ΗΛΑ-Β27 (human leucocyte antigen-B27) και η κατανομή της νόσου είναι παράλληλη με την κατανομή του ΗΛΑ-Β27 στους εθνικούς πληθυσμούς^[276]. Αν και ο ρόλος του ΗΛΑ-Β27 στην ΑΣ δεν έχει εξηγηθεί, έχει προταθεί ότι περιλαμβάνει τροποποιημένη ανοσολογική απόκριση, η οποία διεγείρει τον φλεγμονώδη καταρράκτη. Έχει διαπιστωθεί ότι ο TNF-α υπερεκφράζεται στις ιερολαγόνιες αρθρώσεις, γεγονός που αποτελεί την επιστημονική βάση για τη χρήση των αναστολέων του TNFα, οι οποίοι έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην ΑΣ, καθώς μειώνουν την ενεργότητα της νόσου και την ακαμψία^[277].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ασθενείς με ΑΣ σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα HDL-C. Παράλληλα, μελέτες υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με ενεργή ΑΣ παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα του συσχετιζόμενου με την HDL SAA και μειωμένη δραστηριότητα της PON1 του πλάσματος. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η

θεραπεία έναντι του TNF-α οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της HDL-C και της apoA-I σε ασθενείς με ΑΣ. Η περαιτέρω διερεύνηση της διαταραχής των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL σε ασθενείς με ΑΣ ίσως συμβάλλει στην κατανόηση του αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου που παρατηρείται στους ασθενείς αυτούς.

1.11 Θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν την apoA-I και την HDL

Οι φαρμακολογικές προσεγγίσεις για τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης αρχικά είχαν επικεντρωθεί στη μείωση των επιπέδων της LDL-C. Έκτοτε όμως, η επισήμανση των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL από πολυάριθμες μελέτες έχει ανάγει την αύξηση των επιπέδων της HDL και της apoA-I σε θεραπευτικό στόχο για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές νέες στρατηγικές για την προσέγγιση αυτού του σκοπού.

Οι διαθέσιμες θεραπείες που στοχεύουν την αποκατάσταση του λιπιδικού προφίλ του πλάσματος δεν είναι ειδικά σχεδιασμένες να επιδρούν στην HDL και επομένως έχουν μέτρια αποτελέσματα στα επίπεδα της HDL-C (2-30%)^[278,279]. Οι στατίνες (μειώνουν τα επίπεδα της LDL-C) αποτελούν την πιο διαδεδομένη θεραπεία για την πρόληψη της ΚΑΝ, ενώ οι φιβράτες χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων. Η νιασίνη, αν και επιφέρει τη μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα της HDL-C, χρησιμοποιείται περιορισμένα, λόγω των παρενεργειών της. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν ως στόχο την αύξηση των επιπέδων της HDL-C ή τη βελτίωση της λειτουργικότητας της HDL αναπτύσσονται ως συμπληρωματικές θεραπείες των στατινών και των φιβπρατών για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου.

Οι προσεγγίσεις αυτές περιλαμβάνουν αναστολείς της CETP, νέους αγωνιστές του PPAR και αγωνιστές του LXR^[280]. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν σχεδιαστεί τέσσερις αναστολείς της CETP, το torcetrapib, το dalcetrapib, το evacetrapib και το anacetrapib. Οι μελέτες ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand Its Impact in Atherosclerotic Events), dal-OUTCOMES, ACCELERATE (Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at a High Risk for Vascular Outcomes) και REVEAL (Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid Modification) που εξέτασαν, αντίστοιχα, τα torcetrapib, dalcetrapib,

enacetrapib και anacetrapib έδειξαν ότι και οι τέσσερις αναστολείς της CETP οδηγούν σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της HDL-C^[281,282]. Ωστόσο, οι δοκιμές αυτές τερματίστηκαν είτε λόγω των παρενεργειών των φαρμάκων είτε λόγω της αναποτελεσματικότητας αυτών να μειώσουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο^[283,284]. Συλλογικά, οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι η αύξηση των επιπέδων της HDL-C ίσως να μην αποτελεί τον βέλτιστο θεραπευτικό στόχο και ότι η ποιότητα των HDL σωματιδίων μπορεί να είναι πιο συναφής με την αθηροπροστασία. Περαιτέρω, εκτός από τις φιμπράτες, έχουν αναπτυχθεί αρκετοί ειδικοί αγωνιστές του PPAR, οι οποίοι βρίσκονται σε φάσεις κλινικών δομικών και φαίνεται να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα, χωρίς παρενέργειες^[285]. Τέλος, οι αγωνιστές του LXR φαίνεται να έχουν θετικές επιδράσεις σε αθηροσκληρωτικά μοντέλα ζώων, αλλά δεν έχουν περάσει τουλάχιστον ακόμα σε φάσεις κλινικών δοκιμών, λόγω των παρενεργειών τους (ηπατική λιπογένεση, υπερτριγλυκεριδαιμία)^[286,287].

Παρά την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν την αύξηση των επιπέδων της HDL-C, οι περισσότερες από αυτές δεν κατάφεραν να μειώσουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη στρατηγικών που βελτιώνουν τη λειτουργικότητα της HDL. Ως κύριο λειτουργικό συστατικό της HDL, η αποΑ-I έχει αποτελέσει έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για τη μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων και έχουν αναπτυχθεί αρκετές φαρμακολογικές προσεγγίσεις που μιμούνται τη λειτουργία και τη δομή της, συμπεριλαμβανομένης της χορήγησης της πλήρους μήκους αποΑ-I, μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I και μιμητικών πεπτιδίων της αποΑ-I.

Τα μιμητικά πεπτίδια της αποΑ-I είναι μικρά πεπτίδια 18-36 αμινοξέων, τα οποία έχουν σχεδιαστεί σύμφωνα με την αλληλουχία της αποΑ-I, ώστε να μιμούνται τις αμφιπαθείς α-έλικες της πρωτεΐνης. Έως τώρα έχει εξεταστεί ένας σημαντικός αριθμός πεπτιδίων. Έχει δειχθεί ότι η χορήγηση του πεπτιδίου 4F (στοματικά ενεργό πεπτίδιο 18α) βελτιώνει τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL και προάγει την εκροή χοληστερόλης σε μοντέλα ζώων^[288]. Ωστόσο, χορήγηση του 4F σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο έχει οδηγήσει σε αντικρουόμενα συμπεράσματα^[289,290]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι το πεπτίδιο 5A επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του ABCA1, ενώ σύμπλοκο αυτού του πεπτιδίου με φωσφολιπίδια μπορεί να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω των ABCA1 και ABCG1. Χορήγηση αυτού του συμπλόκου σε μυς με ανεπάρκεια της αποΕ

οδήγησε σε αύξηση της πορείας RCT και ανέστειλε την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης^[291]. Επιπρόσθετα, μελέτες υποδεικνύουν ότι το πεπτιδίο ETC-642, που αποτελείται από 22αα, συμπλεγμένο με φωσφολιπίδια οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της oxLDL^[292]. Παράλληλα, έχει δειχθεί *in vitro* και *in vivo*, αντίστοιχα, ότι το ETC-642 επάγει την εκροή χοληστερόλης από ανθρώπινα μακροφάγα και αυξάνει την πορεία RCT^[293]. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του πεπτιδίου υποστηρίζονται επίσης από μελέτες σε μοντέλα κονίκλων με οξεία και χρόνια φλεγμονή^[293].

Στα ίδια πλαίσια, η χορήγηση της ελεύθερης λιπιδίων ή λιπιδιωμένης αποA-I έχει εξεταστεί ως θεραπευτική προσέγγιση έναντι της αθηροσκλήρωσης. Μελέτες σε υπερλιπιδαιμικούς κονίκλους υποδηλώνουν ότι η χορήγηση της αποA-I οδήγησε σε μείωση των αθηρωματικών πλακών^[294]. Παρόμοια, επίμυες με ανεπάρκεια της αποA-I ανέπτυξαν περισσότερες αθηρωματικές πλάκες, συγκριτικά με φυσιολογικούς επίμυς, ενώ διαγονιδιακή υπερέκφραση ή ενδοφλέβια έγχυση της αποA-I οδήγησε σε μείωση του σχηματισμού των πλακών^[46]. Επιπρόσθετα, ως θεραπευτική προσέγγιση για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου έχει χρησιμοποιηθεί η αποA-I^{Milano} (αποA-I[R173C]), η οποία σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα HDL-C^[295], αλλά εμφανίζει αξιοσημείωτες αντιαθηρογόνες ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ABCA1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης και της αντιφλεγμονώδους δράσης^[296]. Ενδοφλέβια χορήγηση της ανασυνδυασμένης αποA-I^{Milano} σε κονίκλους με διατροφή πλούσια σε χοληστερόλη είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του όγκου της αθηρωματικής πλάκας που είχε αναπτυχθεί^[297]. Επίσης, η ενδοφλέβια χορήγηση rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I^{Milano} (ETC-216) σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο οδήγησε σε σημαντική μείωση της στεφανιαίας αθηρωματικής πλάκας^[298]. Ωστόσο, οι σοβαρές παρενέργειες που παρουσίασε το ETC-216 απέτρεψαν την περαιτέρω αξιολόγησή του. Η ακόλουθη βελτιστοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας του ETC-216 οδήγησε στη σύνθεση του MDCO-216^[299]. Η ενδοφλέβια χορήγηση του MDCO-216 σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο είχε μεν ως αποτέλεσμα την αύξηση της εκροής χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1, αλλά δεν κατάφερε να μειώσει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε αυτή την ομάδα ασθενών^[300]. Περαιτέρω, η χορήγηση rHDL σωματιδίων που περιέχουν την ανθρώπινη αποA-I και φωσφατιδυλοχολίνη (CSL-112) σε υγιείς ανθρώπους, καθώς και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

οδήγησε αμφότερα σε αύξηση των επιπέδων της apoA-I και της HDL και συνοδεύτηκε από αύξηση της ABCA1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης^[301].

Παρά την αποτυχία των περισσότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων που είχαν ως στόχο την αύξηση των επιπέδων της HDL-C, οι θεραπευτικές στρατηγικές που έχουν στόχο τη λειτουργικότητα της HDL είναι ιδιαίτερα υποσχόμενες έναντι της μείωσης του κινδύνου της εμφάνισης των καρδιαγγειακών επεισοδίων. Συνολικά, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε δυσλειτουργική HDL, αλλά και των οδών σηματοδότησης που εμπλέκονται στις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL ίσως διευκολύνει την ανάπτυξη νέων καινοτόμων στρατηγικών για της θεραπεία της καρδιαγγειακή νόσου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Παρά τις προόδους που έχουν σημειωθεί στη σύγχρονη ιατρική για την αντιμετώπιση των θανατηφόρων καρδιαγγειακών επεισοδίων, η καρδιαγγειακή νόσος (ΚΑΝ) παραμένει η πρωταρχική αιτία θανάτου παγκοσμίως. Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν καταδείξει μια αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της χοληστερόλης της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) του πλάσματος και του κινδύνου ανάπτυξης ΚΑΝ. Παράλληλα όμως, μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα υποστηρίζουν ότι τα υψηλά επίπεδα HDL-C πρέπει να συνοδεύονται από την ύπαρξη δομικά σωστής και λειτουργικής HDL. Κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL αποτελεί η απολιποπρωτεΐνη Α-Ι (αποΑ-Ι), η οποία διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη βιογένεση, τη δομή, τις λειτουργίες της HDL, καθώς και στη ρύθμιση των επιπέδων της HDL-C στο πλάσμα. Η αποΑ-Ι εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ ελεύθερη λιπιδίων και αλληλεπιδρά με πλήθος πρωτεϊνών που συμμετέχουν ενεργά στη βιογένεση, τον μεταβολισμό και τις λειτουργίες της HDL. Αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η επαγωγή μηχανισμών που θεωρείται ότι συμβάλλουν στην προστασία έναντι της αθηροσκλήρωσης. Σημαντικές αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποΑ-Ι και/ή της HDL είναι, μεταξύ άλλων, η απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αγγείων, η αντιοξειδωτική δράση, η αντιφλεγμονώδης δράση, καθώς και η διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου.

Έχει δειχθεί ότι σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η χρόνια φλεγμονή και οι ρευματικές παθήσεις, η πρωτεϊνική σύσταση της HDL μεταβάλλεται με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε δυσλειτουργική και συχνά προ-αθηρογόνο. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι σημειακές μεταλλάξεις της αποΑ-Ι οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πρόωρης αθηροσκλήρωσης, ακόμα και ανεξαρτήτως των επιπέδων της HDL-C στο πλάσμα. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι αφενός ο χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων της HDL σε παθολογικές καταστάσεις και αφετέρου η μελέτη της επίδρασης της σχέσης δομής-λειτουργίας της αποΑ-Ι στον μεταβολισμό και τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της αποΑ-Ι/HDL.

Στη μελέτη αυτή θα χαρακτηριστούν οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL από ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ), μία χρόνια, φλεγμονώδη, ρευματική νόσο με αυξημένη θνησιμότητα, η οποία οφείλεται μερικώς σε καρδιαγγειακά αίτια. Για να διαπιστωθεί εάν επηρεάζονται οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL ασθενών με ΑΣ, θα αξιολογηθούν οι αντιοξειδωτικές/ αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HDL και θα εξεταστεί η ικανότητα της HDL να επάγει εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα κύτταρα.

Επίσης, η μελέτη αυτή θα εστιάσει στη διερεύνηση της σχέσης της δομής της αποΑ-I, παρουσία φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων, με τις λειτουργίες και τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποΑ-I/HDL. Το υψηλό ποσοστό δομής α-έλικας σε συνδυασμό με τη σημαντική δομική πλαστικότητα που χαρακτηρίζει την αποΑ-I της επιτρέπουν να υπόκειται διαμορφωτικές αλλαγές, οι οποίες είναι απαραίτητες κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών λειτουργιών της, όπως η δέσμευση λιπιδίων και οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η εισαγωγή μιας μετάλλαξης, ακόμη και σημειακής, ίσως επιφέρει αλλαγές στη δομική ακεραιότητα του μορίου της αποΑ-I, οι οποίες μπορεί να συντελούν σε διαφοροποιήσεις της λειτουργικότητας τόσο της αποΑ-I, όσο και της HDL, οδηγώντας πιθανώς σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, θα εξεταστεί πως τρεις φυσικά απαντώμενες σημειακές μεταλλάξεις στην αποΑ-I, οι Leu144Arg (L144R), Ala164Ser (A164S) και Leu178Pro (L178P), οι οποίες έχουν σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C στο πλάσμα, επηρεάζουν τη δομή και τις ιδιότητες της αποΑ-I/HDL. Παράλληλα, θα μελετηθεί η επίδραση μιας νέας φυσικά απαντώμενης μετάλλαξης, της Val19Leu (V19L), η οποία αποτελεί τη μοναδική μετάλλαξη στην αποΑ-I που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HDL-C και μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ, στη δομή και τη λειτουργία της αποΑ-I/HDL.

Για την προσέγγιση των σκοπών της εργασίας, θα αναπτυχθεί ένα πρωτόκολλο βακτηριακής έκφρασης και καθαρισμού ανασυνδυασμένης αποΑ-I, το οποίο να οδηγεί στην αποτελεσματική και σε υψηλά ποσοστά παραγωγή της καθαρής αποΑ-I άγριου τύπου, αλλά και των μεταλλαγμένων μορφών της. Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I θα χαρακτηριστούν ως προς τις βιοφυσικές τους ιδιότητες και θα συγκριθούν με την αποΑ-I άγριου τύπου στα πλαίσια της δευτεροταγούς δομής, με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (circular dichroism, CD), της θερμοδυναμικής σταθερότητας, παρακολουθώντας τα προφίλ θερμικής και χημικής αποδιάταξης, καθώς και της έκτασης της έκθεσης των

υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στον διαλύτη, με τη χρήση φθορίζοντος ιχνηθέτη. Στην περίπτωση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P θα διερευνηθεί επίσης η επίδραση αυτών στη διαμορφωτική συμπεριφορά του μορίου της apoA-I με τη διεξαγωγή προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Για τη μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων στη δομή και τη θερμοδυναμική σταθερότητα της apoA-I ως συστατικό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, θα παρασκευαστούν δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (reconstituted HDL, rHDL), τα οποία θα περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες apoA-I, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη και θα καταγραφούν τα φάσματα CD και τα προφίλ θερμικής αποδιάταξης αυτών των σωματιδίων. Η λειτουργική ανάλυση που θα λάβει χώρα θα περιλαμβάνει τη μελέτη της ικανότητας της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I να επάγει την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1, μια διαδικασία που αποτελεί το πρώτο βήμα της πορείας βιογένεσης της HDL. Επιπρόσθετα, θα μελετηθεί η ικανότητα των rHDL σωματιδίων που περιέχουν τις apoA-I να επάγουν την εκροή χοληστερόλης, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1 και του υποδοχέα της HDL, SR-BI, δύο πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην πορεία αναδιοργάνωσης της HDL και συμβάλλουν στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Στην περίπτωση της μετάλλαξης V19L, θα μελετηθεί επιπλέον η επίδρασή της στην ικανότητα της λιπιδιωμένης apoA-I να ενεργοποιεί το ένζυμο εστεροποίησης της χοληστερόλης LCAT που συμμετέχει στον σχηματισμό σφαιρικής λειτουργικής HDL. Τέλος, θα μελετηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων στην ικανότητα της λιπιδιωμένης apoA-I να επάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου κατά την επούλωση τραύματος.

Απώτερος στόχος της παρούσας διατριβής είναι να βοηθήσει στην εις βάθος κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε αλλαγές των επιπέδων, της δομής, της σύστασης και των λειτουργιών της HDL, ώστε να αναπτυχθούν νέοι τρόποι για τη διάγνωση και πρόγνωση του κινδύνου ανάπτυξης ΚΑΝ. Επιπρόσθετα, η διασαφήνιση της σχέσης της δομής της apoA-I με τις λειτουργίες της apoA-I/HDL θα μπορούσε να συνδράμει στην εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που αποσκοπούν στην επιδιόρθωση των χαμηλών επιπέδων ή των διαταραγμένων ιδιοτήτων της HDL στο πλάσμα και την πρόληψη ή την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης σε ασθενείς με μεταλλάξεις στην apoA-I.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Απομόνωση HDL από τον ορό του αίματος

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ορός αίματος ανθρώπου.
- Θειική δεξτράνη (Dextranalip 50, Sigma-Aldrich).
- Υδατικό διάλυμα 20 g/L θειικής δεξτράνης.
- Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) (Sigma-Aldrich).
- Υδατικό διάλυμα 1 M $MgCl_2$.
- Ενεργό αντιδραστήριο: Διάλυμα 10 g/L θειικής δεξτράνης και 0,5 M $MgCl_2$.
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).

Αρχή της μεθόδου

Οι μηχανισμοί καθίζησης των λιποπρωτεϊνών από πολυανιόντα και δισθενή κατιόντα δεν είναι γνωστοί με μεγάλη ακρίβεια. Παρ' όλα 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 τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες (π.χ. φωσφολιπιδίων) των λιποπρωτεϊνών, ευνοώντας τον 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 φυγοκέντρηση^[302].

Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια αφήνονται εκτός ψυγείου πριν τη χρήση τους, ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε δείγμα ορού προστίθεται ενεργό αντιδραστήριο σε αναλογία όγκου 10:1. Το μείγμα αναμειγνύεται ισχυρά, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στους 4°C, για 40 min, στα 12.500 rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται σε νέο σωληνάριο.

3.2 Απομόνωση LDL από τον ορό του αίματος

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Βρωμιούχο κάλιο (KBr) (Sigma-Aldrich).
- Υπερφυγόκεντρος (L8-80M, Beckman), κεφαλή 50,2 Ti.
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου, όγκου 30 mL (Beckman).
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 10x, χωρίς Ca^{2+} ή Mg^{2+} (Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca^{2+} or Mg^{2+} 10x, DPBS) (Lonza).
- Μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους 12 kDa (Sigma-Aldrich).

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών γίνεται με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους, που καθορίζεται από την επίπλευσή τους σε διαβάθμιση διαλύματος KBr, έπειτα από υπερφυγοκέντρωση.

Πειραματική διαδικασία

Προστίθεται στον ορό ποσότητα KBr, που υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση: $g\text{ KBr}/\text{mL} = 1 \times (\rho - 1) / 1 - (0,298 \times \rho)$, όπου ρ : η πυκνότητα που πρέπει να έχει ο ορός. Η πυκνότητα του ορού πρέπει να είναι 1,063 mg/mL, ώστε να καταβυθιστεί η HDL και να επιπλεύσουν οι λιποπρωτεΐνες, LDL, IDL και VLDL, με πυκνότητα <1,063 mg/mL. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση του μείγματος στους 6 °C, για 22 h, στα 40.000 rpm. Κατόπιν, το υπερκείμενο συλλέγεται προσεκτικά, μετράται ο όγκος του και προστίθεται ποσότητα DPBS 1x, που υπολογίζεται, με βάση την εξίσωση: $V_{\text{PBS}} = V_{\text{LDL, IDL, VLDL}} \times (1,063 - \rho) / (\rho - 1)$. Η πυκνότητα πρέπει να είναι 1,019 mg/mL, ώστε να καταβυθιστεί η LDL και να επιπλεύσουν οι λιποπρωτεΐνες, IDL και VLDL, με πυκνότητα <1,019 mg/mL. Το μείγμα υπερφυγοκεντρείται στους 6 °C, για 22 h, στα 40.000 rpm. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα της LDL αφήνεται με 1-2 mL υγρού στους 4 °C, για 2 h, ώστε να επαναδιαλυτοποιηθεί. Τελικά, γίνεται διαπίδυση του δείγματος έναντι DPBS 1x, με τη χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πόρων, που επιτρέπουν τη διέλευση μορίων μοριακής μάζας μικρότερης των 12 kDa, ώστε να απομακρυνθεί το KBr. Η διαπίδυση διεξάγεται στους 4 °C, για 24 h, στη διάρκεια των οποίων γίνονται τρεις αλλαγές του διαλύματος διαπίδυσης. Μετά

το πέρας της διαπίδυσης, η LDL αφήνεται να οξειδωθεί σε αέρα, για 24 h, υπό ανακίνηση και φυλάσσεται στους 4 °C, για περαιτέρω πειραματική χρήση.

3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χοληστερόλης

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ορός αίματος ανθρώπου ή απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (βλ. παρ. 3.1) ή rHDL σωματίδια (βλ. παρ. 3.15.1).
- Εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη συσκευασία βιολογικής αποτίμησης (κιτ) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χοληστερόλης, Labkit Cholesterol (Chemelex), που περιέχει:
 - Πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης: Η συγκέντρωση χοληστερόλης είναι 200 mg/dL. Το πρότυπο διάλυμα αραιώνεται 1 προς 4 σε DPBS 1x, πριν τη χρήση.
 - Αντιδραστήριο προσδιορισμού χοληστερόλης (Chemelex): 1.000 U/L εστεράση χοληστερόλης, 300 U/L οξειδάση χοληστερόλης, 650 U/L υπεροξειδάση, 0,4 mmol/L 4-αμινοφαιναζόνη, 26 mmol/L φαινόλη, 90 mmol/L ρυθμιστικό διάλυμα, pH 6,9.
- DPBS 10x (Lonza).
- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200).

Αρχή της Μεθόδου

Η συγκέντρωση της χοληστερόλης προσδιορίζεται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, οι εστέρες χοληστερόλης υδρολύονται από την εστεράση της χοληστερόλης σε χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η ελεύθερη χοληστερόλη, συμπεριλαμβανομένης και εκείνης που υπήρχε αρχικά, οξειδώνεται στη συνέχεια από την οξειδάση της χοληστερόλης σε χολεστ-4-εν-3-όνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το H₂O₂ αντιδρά με τη φαινόλη και την 4-αμινοφαιναζόνη και σχηματίζει ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα, του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505 nm^[303].

Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο 96 φρεατίων αναμειγνύονται 5 ή 10 μL δείγματος σε τελικό όγκο 20 ή 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος (του εκάστοτε δείγματος) με 300 μL

χρωμογόνου αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια, το πλακίδιο επωάζεται στους 37 °C, για 10 min και μετράται η απορρόφηση στα 505 nm. Παράλληλα, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με την προσθήκη κατάλληλων όγκων αραιωμένου προτύπου διαλύματος (τελική ποσότητα χοληστερόλης ανά φρεάτιο: 0,5, 1, 2, 3 και 6 µg) σε τελικό όγκο 20 ή 30 µL ρυθμιστικού διαλύματος, ακολουθώντας την ίδια κατεργασία. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος. Η περιεχόμενη στα δείγματα ποσότητα χοληστερόλης υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

3.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ορός αίματος ανθρώπου.
- Εμπορικά διαθέσιμο κιτ προσδιορισμού της συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων, Infinity Triglycerides (Thermo Fisher Scientific), που περιέχει:
 - Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός: Λυοφιλοποιημένος ορός ζωικής προέλευσης (βόειας) που περιέχει γνωστές συγκεντρώσεις λιπιδίων. Η ανασύσταση του βαθμονομητή γίνεται με την προσθήκη 3 mL H₂O. Η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων είναι 158 mg/dL.
 - Αντιδραστήριο προσδιορισμού τριγλυκεριδίων: 2,6 mmol/L ATP, 2,5 mmol/L οξικό μαγνήσιο, 2.000 U/L> λιπάση, 100 U/L> κινάση της γλυκερόλης, 3.000 mmol/L> οξειδάση της φωσφο-γλυκερόλης, 300 U/L> υπεροξειδάση, 0,8 mmol/L 4-αμινοαντιπυρίνη, 1 mmol/L 3,5-διχλωρο-2-υδροξυ-βενζοσουλφονικό οξύ, 53 mmol/L ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7,0.
- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200).

Αρχή της Μεθόδου

Η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων προσδιορίζεται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, τα τριγλυκερίδια υδρολύονται από τη λιπάση σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Η γλυκερόλη παρουσία ATP φωσφορυλιώνεται από την κινάση της γλυκερόλης, παράγοντας 3-φωσφο-γλυκερόλη και ADP. Κατόπιν, η 3-φωσφο-γλυκερόλη

οξειδώνεται σε φωσφο-διϋδροξυ-ακετόνη από την οξειδάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης, παράγοντας H_2O_2 . Τελικά, το H_2O_2 αντιδρά με 3,5-διχλωρο-2-υδροξυ-βενζοσουλφονικό οξύ και 4-αμινοαντιπυρίνη σε μία αντίδραση που καταλύεται από υπεροξειδάση και σχηματίζει προϊόν κόκκινου χρώματος, του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505 nm.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο 96 φρεατίων αναμειγνύονται 5 μL δείγματος σε τελικό όγκο 20 μL ρυθμιστικού διαλύματος (του εκάστοτε δείγματος) με 300 μL χρωμογόνου αντιδραστήριου. Στη συνέχεια, το πλακίδιο επωάζεται στους 37 °C, για 10 min και μετράται η απορρόφηση στα 505 nm. Παράλληλα, κατάλληλοι όγκοι διαλύματος του βαθμονομητή πρότυπου ορού (τελική ποσότητα τριγλυκεριδίων ανά φρεάτιο: 3,16, 6,32, 9,48, 18,96, και 31,6 μg) προστίθενται σε τελικό όγκο 20 μL ρυθμιστικού διαλύματος και υφίστανται την ίδια κατεργασία. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος (20 μL). Η περιεχόμενη στα δείγματα ποσότητα τριγλυκεριδίων υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

3.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης απολιποπρωτεΐνης A-I

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ορός αίματος ανθρώπου.
- Εμπορικά διαθέσιμο κιτ προσδιορισμού της συγκέντρωσης αποA-I, Labkit APO A1 (Chemelex), που περιέχει:
 - Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός: Λυοφιλοποιημένος ορός ανθρώπινης προέλευσης που περιέχει γνωστές συγκεντρώσεις απολιποπρωτεϊνών. Η ανασύσταση του βαθμονομητή γίνεται με την προσθήκη 1 mL H_2O . Η συγκέντρωση της αποA-I είναι 133 mg/dL.
 - Αντιδραστήριο 1 (R1): 20 mmol/L Tris, πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), pH 8,3, 0,95 g/L νατραζίδιο.
 - Αντιδραστήριο 2 (R2): Αντίσωμα αίγας έναντι της ανθρώπινης αποA-I, 50 mmol/L Tris, pH 7,5, 0,95 g/L νατραζίδιο.
- NaCl (Applichem).
- Διάλυμα 9 g/L NaCl.
- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-one).

- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200).

Αρχή της Μεθόδου

Η συγκέντρωση της αποΑ-I προσδιορίζεται ανοσοθολομετρικά, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης αποΑ-I αναμειγνύεται με δείγματα HDL που περιέχουν αποΑ-I και σχηματίζει αδιάλυτα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος. Τα αδιάλυτα αυτά σύμπλοκα προκαλούν αλλαγή στην απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αποΑ-I, που περιέχεται στο δείγμα.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διαδοχικές αραιώσεις του βαθμονομητή πρότυπου ορού σε διάλυμα NaCl (τελική ποσότητα αποΑ-I ανά φρεάτιο: 0,266, 0,665, 1,33, 1,995 και 2,66 µg). Κατόπιν, τα δείγματα αραιώνονται 1:1 v/v σε διάλυμα NaCl. Σε πλακίδιο 96 φρεατίων αναμειγνύονται 2 µL δείγματος ή προτύπων με 200 µL διαλύματος R1 και μετράται η απορρόφηση στα 340 nm, στους 37 °C. Κατόπιν, προστίθενται 50 µL αντιδραστηρίου R2 και το πλακίδιο επωάζεται για 2 min, στους 37 °C. Η απορρόφηση μετράται πάλι στα 340 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το NaCl (2 µL). Η περιεχόμενη στα δείγματα ποσότητα πρωτεΐνης υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη, αφαιρώντας πρώτα την πρώτη μέτρηση της απορρόφησης από τη δεύτερη.

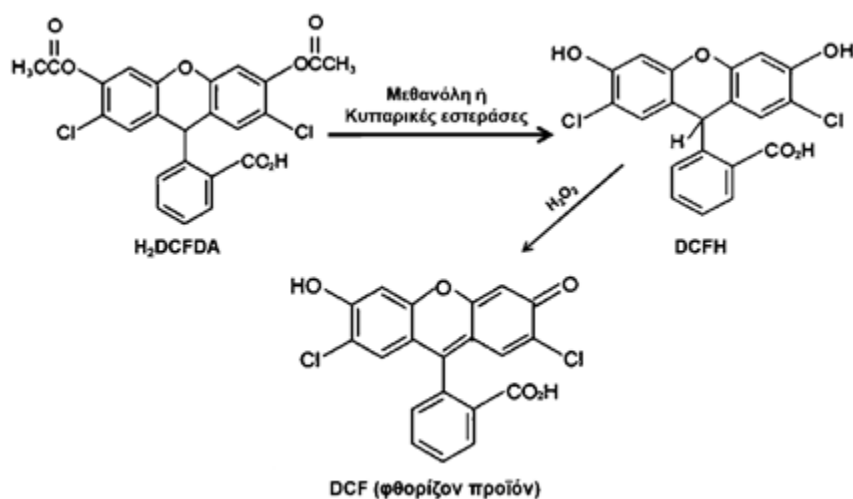
3.6 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των HDL με τη δοκιμασία DCF

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (βλ. παρ. 3.1)
- Οξειδωμένη LDL μέσω αέρα (βλ. παρ. 3.2).
- Διοξικός εστέρας της 2',7'-διχλωρο-διϋδρο-φλουορεσκεΐνης (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, H₂DCFDA) (Invitrogen).
- DPBS 10x (Lonza).
- Μεθανόλη (CH₃OH) (Sigma-Aldrich).
- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-one).
- Ανακινούμενος επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200).

Αρχή της Μεθόδου

Η ικανότητα της HDL να αναστέλλει την οξείδωση της ανθρώπινης LDL ή να απενεργοποιεί τα ήδη οξειδωμένα λιπίδια της ελέγχεται *in vitro*, με τη χρήση της 2',7'-διχλωροδιϋδροφλουορεσκίνης (DCFH). Όταν η DCFH αλληλεπιδρά με προϊόντα υπεροξείδωσης λιπιδίων, που περιέχονται στις LDL, οξειδώνεται προς τη φθορίζουσα ένωση 2',7'-διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF) (Εικόνα 3.1). Η ένταση του φθορισμού, που παράγεται, μετράται σε φθορισμόμετρο. Οι φυσιολογικές HDL απενεργοποιούν τα οξειδωμένα λιπίδια των LDL, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τη DCFH. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των HDL προσδιορίζονται με τη μέτρηση στην αλλαγή της έντασης του φθορισμού από την οξείδωση της DCFH παρουσία ή απουσία LDL^[304,305].



Εικόνα 3.1. Αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη δοκιμασία DCF.

Πειραματική διαδικασία

Ο H_2DCFDA 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, ώστε να υδρολυθεί ο εστερικός δεσμός και να απελευθερωθεί η $DCFH$. Στη συνέχεια, μοιράζεται σε σωλήνες τύπου erpendorf, διαβιβάζεται ρεύμα N_2 , για να αποφευχθεί η οξείδωση και φυλάσσεται στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Την ημέρα του πειράματος, η $DCFH$ αραιώνεται 1:10 v/v με DPBS 1x. Σε κάθε φρεάτιο του πλακιδίου προστίθενται HDL σε συγκέντρωση χοληστερόλης 50 $\mu\text{g/mL}$ μάρτυρα ή ασθενούς, παρουσία ή απουσία LDL, σε συγκέντρωση χοληστερόλης 100 $\mu\text{g/mL}$, σε τελικό όγκο 100 μL DPBS 1x. Κατόπιν, το πλακίδιο επωάζεται στους $37\text{ }^\circ\text{C}$, υπό ανακίνηση στα 80 rpm, για 1 h. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθενται σε κάθε

φρεάτιο 10 μL διαλύματος DCFH και το πλακίδιο επωάζεται για ακόμα 2 h, στους 37°C , υπό ανακίνηση στα 80 rpm. Τέλος, η ένταση του φθορισμού που παράγεται μετράται στα 535 nm, έπειτα από διέγερση στα 465 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το DPBS 1x.

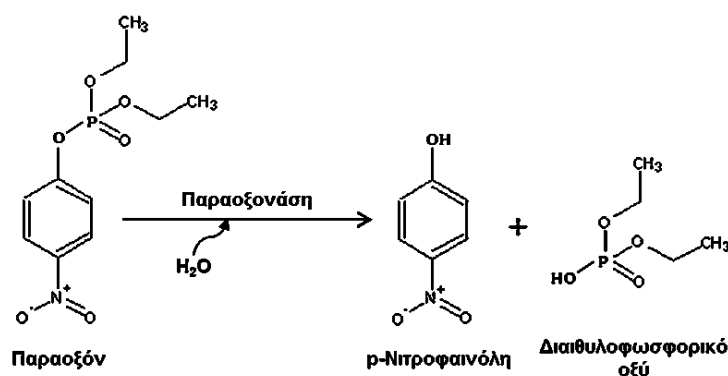
3.7 Προσδιορισμός της δραστηρότητας του ενζύμου παραοξονάση 1 (PON1)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (βλ. παρ. 3.1).
- Διάλυμα 4,2 M διαιθυλο-π-νιτροφαινυλοφωσφορικού εστέρα (παραοξόν) (Sigma-Aldrich).
- CaCl_2 (Sigma-Aldrich).
- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Applichem).
- Διάλυμα μέτρησης δραστηρότητας PON1 έναντι παραοξόν: 100 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , pH 8,0.
- Διάλυμα εργασίας παραοξονάσης 1: 5,61 mM παραοξόν σε ρυθμιστικό διάλυμα μέτρησης δραστηρότητας PON1 έναντι παραοξόν.
- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200).

Αρχή της Μεθόδου

Το παραοξόν μετατρέπεται, υπό τη δράση του ενζύμου PON1 (δραστηρότητα παραοξονάσης 1), σε p-νιτροφαινόλη και διαιθυλοφωσφορικό οξύ (Εικόνα 3.2). Υπολογίζοντας την ποσότητα της p-νιτροφαινόλης που παράγεται, προσδιορίζεται η δραστηρότητα του ενζύμου PON1^[306].



Εικόνα 3.2. Αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τον προσδιορισμό δραστηρότητας της PON1.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο 96 φρεατίων προστίθενται 5 μL δείγματος και 245 μL διαλύματος εργασίας παραοξονάσης. Ο ρυθμός παραγωγής της p-νιτροφαινόλης, που προκύπτει από την υδρόλυση του παραοξόν, μετράται, καταγράφοντας την αύξηση της απορρόφησης στα 405 nm, για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου, σε φασματοφωτόμετρο. Η ποσότητα της p-νιτροφαινόλης που παρήχθη υπολογίζεται, σύμφωνα με την εξίσωση: $c = A \cdot 10^6 \cdot d / \epsilon \cdot b$, όπου c: η συγκέντρωση της p-νιτροφαινόλης στο διάλυμα (U/L), A: η κλίση της απορρόφησης της αντίδρασης στα 405 nm, σε σχέση με τον χρόνο, ϵ : ο συντελεστής μοριακής οπτικής διαδρομής απόσβεσης ($17000 (\text{mol}/\text{mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b: το μήκος της (cm) και d: η αραίωση του δείγματος στον τελικό όγκο της αντίδρασης. Η δραστικότητα της PON1 εκφράζεται σε U/L ορού, ορίζοντας το 1 U ως τη δραστικότητα που καταλύει τον σχηματισμό 1 μmol p-νιτροφαινόλης ανά λεπτό.

3.8 Προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση (MPO)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (βλ. παρ. 3.1).
- Εμπορικά διαθέσιμο κιτ προσδιορισμού της δραστικότητας της MPO, Innozyme MPO Activity kit, (Calbiochem), που περιέχει:
 - Πλακίδια 96 φρεατίων, επιστρωμένα με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης MPO.
 - Πρότυπο διάλυμα MPO, συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
 - Διάλυμα χρωμοφόρου υποστρώματος που περιέχει: 3,3',5,5'-τετρα-μεθυλο-βενζιδίνη (TMB) και H_2O_2 .
 - Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης: 2,5 N H_2SO_4 .
 - Διάλυμα αραίωσης των δειγμάτων και των προτύπων.
- Ανακινούμενος επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite[®] M200).

Αρχή της Μεθόδου

Η δραστικότητα του ενζύμου MPO προσδιορίζεται, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης MPO, που

είναι ακινητοποιημένο στα φρεάτια των πλακιδίων, δεσμεύει ειδικά το ένζυμο MPO, που περιέχεται στα δείγματα των HDL. Η δραστηριότητα της δεσμευμένης MPO μετράται, χρησιμοποιώντας το διάλυμα χρωμοφόρου υποστρώματος που περιέχει TMB και H₂O₂. Μετά την ανάπτυξη χρώματος, η αντίδραση τερματίζεται με H₂SO₄ και η απορρόφηση της οξειδωμένης TMB ανιχνεύεται στα 450 nm.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου διαλύματος σε διάλυμα αραιώσης (τελική συγκέντρωση MPO ανά φρεάτιο: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 ng/mL). Κατόπιν, αραιώνονται 80 μL δείγματος με 20 μL διαλύματος αραιώσης. Στο πλακίδιο 96 φρεατίων προστίθενται 100 μL δείγματος ή προτύπων και το πλακίδιο επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 h, υπό ήπια ανακίνηση. Στη συνέχεια, το πλακίδιο εκπλένεται τέσσερις φορές με 400 μL διαλύματος αραιώσης, κάθε φορά, προστίθενται 100 μL διαλύματος χρωμοφόρου υποστρώματος και επωάζεται στους 37 °C, για 30 min. Η αντίδραση τερματίζεται με 100 μL διαλύματος H₂SO₄ και η απορρόφηση μετράται στα 450 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το διάλυμα αραιώσης (100 μL). Η δραστηριότητα της MPO υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

3.9 Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων

Βακτηριακός μετασχηματισμός καλείται η γενετική τροποποίηση ενός κυττάρου ως αποτέλεσμα της εισόδου, ενσωμάτωσης και έκφρασης εξωγενούς, «γυμνού», γενετικού υλικού προερχόμενο από το περιβάλλον του (βακτήρια, πλασμίδια, κ.α.), μέσω της κυτταρικής του μεμβράνης^[307-309]. *In vitro*, ως φορείς της γενετικής πληροφορίας χρησιμοποιούνται κυρίως πλασμιδικά μόρια ή μόρια DNA φάγου. Λόγω της υδρόφιλης φύσης του DNA, η μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων προς μετασχηματισμό θα πρέπει να καταστεί διαπερατή σε αυτό. Τα κύτταρα των οποίων η μεμβράνη έχει μεταβληθεί κατά τέτοιον τρόπο ώστε το ξένο DNA να μπορεί να εισέλθει εντός του κυττάρου καλούνται επιδεκτικά (competent). Οι μέθοδοι εισαγωγής του νέου γενετικού υλικού στα κύτταρα-ξενιστές ποικίλουν.

3.9.1 Παραγωγή επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων *E.coli* XL1-Blue και BL21-Gold(DE3)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Βακτηριακά κύτταρα *E.coli* XL1-Blue ή BL21-Gold(DE3) (Agilent Technologies).
- Θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) σε σκόνη (Sigma-Aldrich). Σύσταση μέσου μετά την ανασύσταση (2,5% w/v): 10 g/L τρυπτόνη, 10 g/L NaCl και 5 g/L εκχύλισμα ζύμης.
- Διάλυμα LB 2,5% w/v. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C, για 30 min.
- Άγαρ για βακτηριολογία (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα LB-άγαρ: 1,5 % w/v άγαρ σε 2,5 % w/v διάλυμα LB. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C, για 30 min.
- Δις αποσταγμένο (dd) H₂O. Αποστειρώνεται στους 121 °C, για 30 min.
- CaCl₂ (Fluka).
- Διάλυμα 1 M CaCl₂. Το διάλυμα φιλτράρεται πριν από τη χρήση.
- Γλυκερόλη (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα αποθήκευσης κυττάρων: 0,05 M CaCl₂, 20% w/v γλυκερόλη.
- Υγρό N₂.
- Κλίβανος αποστείρωσης (αυτόκαυστο) (Tuttnauer 3870 E).
- Αποστειρωμένα φίλτρα πόρων μεγέθους 2 μm (MilliporeSigma).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου erpendorf, 1,5 mL (Greiner Bio-One).
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια αυτόματων πιπετών.
- Πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου, όγκου 250 mL (Thermo Fisher Scientific).
- Τρυβλία petri.
- Φλόγιστρο.
- Αποστειρωμένη γυάλινη ράβδος, για ομοιόμορφο στρώσιμο των βακτηριακών κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια.
- Ανακινούμενος επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH).
- Φασματοφωτόμετρο (Helios).
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Sorvall RC5C (Du Pont Instruments), κεφαλή GSA.

Αρχή της μεθόδου

Η πιο κοινή μέθοδος για την παραγωγή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων είναι η χημική μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει την κατεργασία αυτών με δισθενή (π.χ. Ca^{2+}) ή πολυσθενή κατιόντα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην απόδοση θετικού φορτίου στο βακτηριακό τοίχωμα των κυττάρων μετά από έκθεση αυτών σε διάλυμα CaCl_2 . Κατά αυτόν τον τρόπο αποτρέπονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων του DNA και των μακρομορίων της εξωτερικής μεμβράνης των κυττάρων, διευκολύνοντας την είσοδο του εξωγενούς γενετικού υλικού στα βακτηριακά κύτταρα^[310].

Πειραματική διαδικασία

Σε σωλήνες τύπου errendorf τοποθετούνται 50 μL βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue ή BL21-Gold(DE3) και επωάζονται στον πάγο, για 30 min. Κατόπιν, προστίθενται 0,95 mL θρεπτικού μέσου LB και τα κύτταρα αναπτύσσονται στους 37 °C, για 1 h, υπό ανακίνηση στα 220 rpm. Ακολούθως, 50 και 100 μL κυττάρων επιστρώνονται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου σε τρυβλία στερεού θρεπτικού μέσου (LB-άγαρ) και επωάζονται στους 37 °C, για 16-18 h. Την επόμενη ημέρα, με τη βοήθεια αποστειρωμένου ακρορυγχίου επιλέγεται μία σπικτή αποικία βακτηριακών κυττάρων και εμβολιάζεται σε 5 mL διαλύματος LB (υγρό θρεπτικό υλικό). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για 16-18 h, στους 37 °C, στα 220 rpm. Στη συνέχεια, 1,5 mL από την υγρή βακτηριακή καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 150 mL διαλύματος LB και η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 30 °C, στα 220 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα του διαλύματος στα 600 nm να είναι 0,4-0,5 (βλ. παρ. 3.12.3). Τότε, η καλλιέργεια μεταφέρεται στα δοχεία φυγοκέντρου και επωάζεται στον πάγο, για 1 h. Ακολουθεί φυγοκέντρωση της καλλιέργειας στα 2.000 rpm, για 10 min, στους 4 °C και αναδιασπορά του ιζήματος των κυττάρων σε 75 mL διαλύματος 0,05 M CaCl_2 ($\frac{1}{2}$ του αρχικού όγκου της καλλιέργειας). Τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 30 min και ακολουθεί φυγοκέντρωση αυτών στις ίδιες συνθήκες με τις προαναφερθείσες. Το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σταδιακά σε 7,5 mL διαλύματος αποθήκευσης κυττάρων και διαμοιράζεται σε σωλήνες τύπου errendorf (100 μL), οι οποίοι ψύχονται άμεσα με υγρό N_2 . Τέλος, τα επιδεκτικά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80 °C και δύνανται να χρησιμοποιηθούν εντός των επόμενων δύο ετών.

3.9.2 Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* XL1-Blue και BL21-Gold(DE3)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* XL1-Blue ή BL21-Gold(DE3) (βλ. παρ. 3.9.1).
- Πλασμιδιακό DNA που φέρει το γονίδιο έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης.
- Αμπικιλίνη (Applichem).
- Διάλυμα 100 mg/mL αμπικιλίνης. Το διάλυμα φιλτράρεται πριν τη χρήση.
- Διάλυμα LB-άγαρ: 1,5 % w/v άγαρ σε 2,5 % w/v διάλυμα LB. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C, για 30 min και κατόπιν προστίθεται αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL.
- Τα επιπλέον υλικά που απαιτούνται για τη διαδικασία είναι όμοια με αυτά της παραγράφου 3.9.1.

Αρχή της μεθόδου

Στην παρούσα εργασία, τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue ή BL21-Gold(DE3) μετασχηματίστηκαν με τον φορέα επιλογής, μέσω θερμικής διέγερσης (heat shock). Αρχικά, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο, παρουσία ιόντων Ca^{2+} και έπειτα υπόκεινται σε θερμική διέγερση, για σύντομο χρονικό διάστημα. Η διαδικασία αυτή αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης των κυττάρων και επιτρέπει την εισαγωγή του ξένου DNA. Η μέθοδος της θερμικής διέγερσης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για κυκλικά μόρια DNA και όχι τόσο για γραμμικά, πιθανόν γιατί οι εξωνουκλεάσες του κυττάρου τα αποικοδομούν γρήγορα^[311]. Ο φορέας που χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό έχει επιλεγεί να φέρει μια επιπλέον, από τα βακτηριακά κύτταρα, ιδιότητα, με σκοπό την εύκολη διάκριση των μετασχηματισμένων από των μη κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, ο φορέας που χρησιμοποιείται, εκτός των επιθυμητών ενθεμάτων, περιέχει το γονίδιο της β-λακταμάσης, η έκφραση του οποίου προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του αντιβιοτικού αμπικιλίνη.

Πειραματική διαδικασία

Σε σωλήνες τύπου erpendorf τοποθετούνται 50 µL επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων και σε αυτά προστίθεται 1 µL (~100 ng DNA) του προς

πολλαπλασιασμό πλασμιδίου. Μετά από ελαφρά ανάμειξη, το μείγμα επωάζεται στον πάγο, για 30 min. Κατόπιν, υφίσταται θερμική διέγερση στους 42 °C, για 45 sec και τοποθετείται πάλι στον πάγο, για 2 min. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθενται 0,95 mL θρεπτικού μέσου LB και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C, για 1 h, στα 220 rpm. Τέλος, 50 και 100 µL καλλιέργειας επιστρώνονται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου, σε τρυβλία στερεού θρεπτικού μέσου (LB-άγαρ) που φέρουν το αντιβιοτικό επιλογής (αμπικικιλίνη 100 µg/mL). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C, για 16-18 h.

3.10 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pET32-αποA-I3C

Οι αρχικοί πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φορέα pET32a-αποA-I3C ήταν οι pFASTBAC-αποA-I και pET32a-E43C. Ο φορέας pFASTBAC-αποA-I περιέχει την πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία της ανθρώπινης αποA-I. Ο φορέας pET32a-E43C περιέχει την πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία της ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης E4 (αποE4) συντηγμένη ανοδικά στο 5' άκρο της με μία ετικέτα θειορεδοξίνης (thioredoxin, Trx) και μία ετικέτα έξι ιστιδινών (6x His-tag). Στο σημείο σύντηξης έχει προστεθεί μία αλληλουχία αμινοξέων που αναγνωρίζεται για πέψη από την πρωτεάση 3C^{I312I}. Σκοπός ήταν να αντικατασταθεί η cDNA αλληλουχία της αποE4 από τον φορέα pET32a-E43C με τη cDNA αλληλουχία της αποA-I. Η πορεία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή του φορέα pET32a-αποA-I3C περιγράφεται παρακάτω.

3.10.1 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ένζυμα περιορισμού:
 - *Bam*HI, 20.000 U/mL (New England Biolabs, NEB).
 - *Sa*II, 20.000 U/mL (New England Biolabs, NEB).
- Ρυθμιστικό διάλυμα NEBufferTM 3.1 10x (New England Biolabs, NEB): 1 M NaCl, 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1 mg/mL BSA, pH 7,9.
- Πλασμιδιακοί φορείς: pET32a-E43C και pFASTBAC-αποA-I.
- Αποστειρωμένο νερό (DEMO).

- Αποστειρωμένα ακρορύγχια αυτόματων πιπεττών.
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου eppendorf, 1,5 mL (Greiner Bio-One).
- Ανακινούμενος επωαστήρας (Shaking Incubator, LabTECH).

Αρχή της μεθόδου

Τα ένζυμα περιορισμού (ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες) είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης, των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος είναι η προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες δίκλωνου DNA 4-8 ζευγών βάσεων και υδρολύουν σε συγκεκριμένες θέσεις τους 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς δύο συνεχόμενων νουκλεοτιδίων^[313,314]. Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί μπορούν να ανασχηματιστούν από άλλα ένζυμα, γνωστά ως DNA λιγάσες.

Πειραματική διαδικασία

Οι πλασμιδιακοί φορείς επωάζονται με τα ένζυμα περιορισμού, *Bam*HI και *Sal*I, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το διάλυμα της αντίδρασης επιλέγεται έτσι ώστε να είναι συμβατό και με τα δύο ένζυμα και να δίνει δραστηριότητα 100%. Οι ποσότητες DNA που χρησιμοποιούνται για τις πέψεις είναι 5 µg από το φορέα pET32a-E43C και 10 µg από το φορέα pFASTBAC-αποA-I. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 37 °C, για 2 h. Στη συνέχεια, τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορούνται σε πηκτή 1% w/v αγαρόζης^[315], ώστε να επιβεβαιωθούν οι διπλές πέψεις των φορέων και οι ζώνες DNA που προκύπτουν συγκρίνονται με τις ζώνες του δείκτη, που έχει συνηλεκτροφορηθεί. Οι ζώνες ενδιαφέροντος (πλασμιδιακός φορέας pET32a και ένθεμα αποA-I) αποκόπτονται από την πηκτή με τη χρήση νυστεριού και το DNA των ζωνών απομονώνεται με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (βλ. παρ. 3.10.2).

3.10.2 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Εμπορικά διαθέσιμο kit για την απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης (NucleoSpin® Extract II Kit, Clontech Laboratories, Inc).
- Αποστειρωμένο νυστέρι.
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου eppendorf, 1,5 mL (Greiner Bio-One).

- Αποστειρωμένα ακρορύγχια αυτόματων πιπεττών.
- Αναλυτικός ζυγός (Satorius TE64).
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας 24 θέσεων (hot plate) (VWR Scientific).
- Κυκλοαναδευτήρας (Vortex-2 Genie, Scientific industries).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).
- Φασματοφωτόμετρο (Nanodrop, ND-1000).

Αρχή της μεθόδου

Το DNA δεσμεύεται ειδικά παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων στη μεμβράνη σιλικόνης που φέρουν οι στήλες που διαθέτει το kit NucleoSpin® Extract. Προσμείξεις που πιθανόν υπάρχουν στο δείγμα DNA, όπως νουκλεοτίδια, άλατα, ένζυμα, απομακρύνονται με έκπλυση της στήλης με διάλυμα αιθανόλης που διαθέτει το kit. Η έκλουση του DNA από τη στήλη πραγματοποιείται με διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος αλάτων και η ανάκτηση του προϊόντος κυμαίνεται μεταξύ 70-95% για τμήματα DNA μήκους 50-10.000 bp¹.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, το τμήμα της πηκτής αγαρόζης που φέρει την επιθυμητή ζώνη DNA αποκόπτεται με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού, ζυγίζεται και για κάθε 100 mg αυτού προστίθενται 200 μL διαλύματος NT. Στη συνέχεια, το μείγμα επωάζεται στους 50 °C, υπό ανάδευση, κάθε 2-3 min, έως την πλήρη διάλυση της πηκτής. Μόλις διαλυθεί πλήρως η πηκτή, το μείγμα προστίθεται σε ειδικές στήλες (NucleoSpin® Extract II columns), οι οποίες έχουν τοποθετηθεί σε κατάλληλα σωληνάρια συλλογής και φυγοκεντρείται για 1 min, στα 11.000 x g. Αφού απορριφθεί το έκπλυμα της στήλης, η μεμβράνη σιλικόνης στην οποία έχει δεσμευθεί το DNA ξεπλένεται με 600 μL διαλύματος NT3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min, στα 11.000 x g, απόρριψη του εκπλύματος και εκ νέου φυγοκέντρηση για 2min, στα 11.000 x g, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων διαλύματος NT3 από τη στήλη. Τελικά, το δεσμευμένο στη στήλη DNA επωάζεται με 15-50 μL διαλύματος NE και εκλούεται έπειτα από

¹ Clontech Laboratories, Inc., NucleoSpin® Extract II Kits User Manual, 2004: <http://www.mbio.ncsu.edu/MB452/molBiol/PT3814-1.pdf>

φυγοκέντρηση για 1 min, στα 11.000 x g. Η συγκέντρωση του καθαρού δείγματος DNA μετράται με φασματοφωτόμετρο.

3.10.3 Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA με συμπληρωματικά άκρα (ligation reaction)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Εμπορικά διαθέσιμο κιτ για την αντίδραση της λιγάσης (T4 DNA ligase, Promega Corporation), το οποίο περιέχει:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα δράσης της λιγάσης 10x: 300 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 2 mM διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT), 10 mM ATP.
 - T4 DNA λιγάση (T4 DNA ligase).
- Απομονωμένα τμήματα DNA (πλασμιδιακός φορέας pET32a και ένθεμα αποA-I) που έχουν πεπτεί με τα δύο ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Sal*I.
- Διάλυμα 100 mM τριφωσφορικής δεοξυαδενοσίνης (dATP) (Invitogen).
- Αποστειρωμένο Νερό (DEMO).
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια αυτόματων πιπετών.
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου eppendorf, 1,5 mL (Greiner Bio-One).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).

Αρχή της μεθόδου

Η DNA λιγάση είναι ένζυμο, το οποίο καταλύει τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3'-OH άκρου ενός νουκλεοτιδίου και του 5'-P άκρου ενός άλλου. Δρα τόσο στα άκρα ενός γραμμικού τμήματος DNA, όσο και μεταξύ δύο διαφορετικών τμημάτων DNA, εφόσον αυτά έχουν συγκολλητικά, τυφλά ή ακόμα και μη συμπληρωματικά άκρα.

Πειραματική διαδικασία

Η αντίδραση σύνδεσης των τμημάτων DNA, pET32a και αποA-I, με τα συμπληρωματικά μονόκλινα άκρα, που προέκυψαν μετά τη διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού και την απομόνωσή τους από την πηκτή αγαρόζης (βλ. παρ. 3.10.1 και 3.10.2), γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή². Η μοριακή

² Promega Corporation: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/t4-dna-ligase-blue-white-cloning-qualified-protocol.pdf>

αναλογία ανάμειξης του πλασμιδιακού φορέα με το ένθεμα DNA είναι 1:3. Τα ng του ενθέματος υπολογίζονται με τον παρακάτω τύπο:

$$X \text{ ng ενθέματος} = \text{ng φορέα} \times \frac{\text{μήκος ενθέματος (bp)}}{\text{μήκος φορέα (bp)}} \times \text{μοριακή αναλογία} \frac{\text{ενθέματος}}{\text{φορέα}}$$

Μετά την ανάμειξη των δύο DNA, προστίθενται 1 μL ATP, 2 μL 10x ρυθμιστικού διαλύματος και ο τελικός όγκος της αντίδρασης διαμορφώνεται στα 20 μL με την προσθήκη H_2O . Το μείγμα φυγοκεντρείται για σύντομο χρονικό διάστημα στα 3.000 rpm και τέλος προστίθεται 1 μL του ενζύμου (T4 DNA λιγάση). Η αντίδραση επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, για 4 h και το προϊόν φυλάσσεται στους -20°C . Ο νέος ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό των επιδεικτικών κύτταρων *E.coli* XL1-Blue (βλ. παρ. 3.9.1-3.9.2). Το πλασμιδιακό DNA πολλαπλασιάζεται σε βακτηριακά κύτταρα και απομονώνεται από αυτά με τη μέθοδο του mini-prep^[316]. Η αλληλουχία του νέου ανασυνδυασμένου φορέα επιβεβαιώνεται με αλληλούχιση (sequencing).

3.11 *In vitro* τοποκατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξιγένεση

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Εμπορικά διαθέσιμο κιτ μεταλλαξιγένεσης, QuickChange II XL site direct mutagenesis kit (Agilent Technologies), που περιέχει:
 - Διάλυμα αντίδρασης 10x.
 - Μείγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs).
 - DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (2,5 U/ μL), (PfuUltra High Fidelity DNA polymerase).
 - Αντιδραστήριο QuickSolution.
 - Ένζυμο περιορισμού Dpn I (10 U/ μL).
 - Υπερεπιδεκτικά κύτταρα *E.coli* XL10-Gold.
 - β -μερκαπτοαιθανόλη (β -ME) (XL10-Gold β -mercaptoethanol mix).
- Πρόσθιοι και οπίσθιοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινήτες που φέρουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις.
- Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pET32a-αποA-l3C.
- Αποστειρωμένο νερό (DEMO).
- Αποστειρωμένα, θερμοανθεκτικά erpendorf, κατάλληλα για PCR.

- Ακρορύγχια αυτόματων πιπιετών αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από DNάσες, RNάσες και γονιδιακό DNA (Greiner Bio-One).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου erpendorf, 1,5 mL (Greiner Bio-One).
- Μηχάνημα PCR (TaKaRa PCR Thermal Cyclers Dice TP600 Ver 300).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).

Αρχή της μεθόδου

Η *in vitro* τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση αποτελεί μια ανεκτίμητη τεχνική για τον χαρακτηρισμό των δυναμικών, πολύπλοκων συσχετισμών μεταξύ της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών, για τη μελέτη στοιχείων γονιδιακής έκφρασης, καθώς και για την εκτέλεση τροποποιήσεων πλασμιδιακών φορέων.

Το kit QuickChange II XL site direct mutagenesis χρησιμοποιείται για την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων, την αντικατάσταση αμινοξέων και την εισαγωγή μεταλλάξεων διαγραφής ή παρεμβολής αμινοξέων. Κατά τη βασική διαδικασία, το υπερελικωμένο δίκλωνο DNA (double stranded DNA, dsDNA) του πλασμιδιακού φορέα που φέρει το ένθεμα ενδιαφέροντος συζεύγνυται με δυο συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι εκκινητές, ο καθένας συμπληρωματικός προς τον κάθε κλώνο του φορέα, επεκτείνονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρουσία πολυμεράσης υψηλής πιστότητας. Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η δημιουργία ενός μεταλλαγμένου πλασμιδιακού φορέα με κομμένα άκρα. Το πλασμιδιακό DNA (μητρικός φορέας) είναι μεθυλιωμένο και ως εκ τούτου επιρρεπές στην πέψη από το ένζυμο περιορισμού Dpn I (αλληλουχία αναγνώρισης: 5'-Gm6ATC-3'), εξειδικευμένο για μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA. Μετά την αντίδραση μεταλλαξιγένεσης, το προϊόν της αντίδρασης πέπτεται με το Dpn I. Ο νέος μεταλλαγμένος φορέας που προκύπτει εισάγεται μέσω μετασχηματισμού σε υπερεπιδεκτικά κύτταρα *E.coli* XL10-Gold, τα οποία επιδιορθώνουν τα κομμένα άκρα του μεταλλαγμένου πλασμιδιακού DNA³.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, σχεδιάζονται οι εκκινητές, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Παρακάτω αναφέρονται τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά τους:

³ Agilent Technologies, Instruction Manual QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Revision E.01 2013. <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200521.pdf>

1. Το μήκος τους κυμαίνεται μεταξύ 25-45 bp, ενώ η επιθυμητή μετάλλαξη τοποθετείται στη μέση της αλληλουχίας με 10-15 bp εκατέρωθεν αυτής.
2. Η μέση θερμοκρασία τήξης (T_m) για κάθε εκκινητή πρέπει να είναι $\geq 78^\circ\text{C}$.
3. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν ελάχιστο περιεχόμενο σε GC 40% και τα άκρα τους πρέπει να τελειώνουν σε μία ή περισσότερες C ή G βάσεις.

Στην παρούσα εργασία εισαγάγαμε τις παρακάτω σημειακές μεταλλάξεις: βαλίνη σε λευκίνη στη θέση 19 στην αμινοξική αλληλουχία της αποA-I (αποA-I[V19L]), λευκίνη σε αργινίνη στη θέση 144 στην αμινοξική αλληλουχία της αποA-I (αποA-I[L144R]), αλανίνη σε σερίνη στη θέση 164 στην αμινοξική αλληλουχία της αποA-I (αποA-I[A164S]) και λευκίνη σε προλίνη στη θέση 178 στην αμινοξική αλληλουχία της αποA-I (αποA-I[L178P]). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών.

	Αλληλουχία εκκινητών
ΑποA-I[V19L]-F	5'-CCTGGCCACTGTGTACCTGGATGTGCTCAAAGACAGC
ΑποA-I[V19L]-R	5'-CGCTGTCTTTGAGCACATCCAGGTACACAGTGGCCAG
ΑποA-I[L144R]-F	5'-AGAAGCTGAGCCCACGGGGCGAGGAGATGCGC-3'
ΑποA-I[L144R]-R	5'-GCGCATCTCCTCGCCCCGTGGGCTCAGCTTCT-3'
ΑποA-I[A164S]-F	5'-GCTGCGCACGCATCTGAGCCCCCTACAGCGACGAG-3'
ΑποA-I[A164S]-R	5'-CTCGTCGCTGTAGGGGCTCAGATGCGTGCGCAGC-3'
ΑποA-I[L178P]-F	5'-GCTTGGCCGCGCGCCCTGAGGCTCTCAAGGAGAA-3'
ΑποA-I[L178P]-R	5'-TTCTCCTTGAGAGCCTCAGGGCGCGGGCCAAGC-3'

Τα μεταλλαγμένα νουκλεοτίδια απεικονίζονται με έντονα μαύρα γράμματα

F: forward (πρόσθιος εκκινητής), **R:** reverse (οπίσθιος εκκινητής).

Η αντίδραση για κάθε μεταλλαξιγένεση ετοιμάζεται, όπως αναγράφεται παρακάτω:

- 5 μl 10x διαλύματος αντίδρασης.
- X μl (100 ng) εκμαγείου DNA pET32a-αποA-I3C.
- X μl (125 ng) πρόσθιου εκκινητή.
- X μl (125 ng) οπίσθιου εκκινητή.
- 1 μl μείγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs).
- 3 μl αντιδραστηρίου QuikSolution.
- Αποστειρωμένο H₂O, ώστε ο όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μL.

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδρώντων, ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη 1μL PfuUltra DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση τοποθετείται στη συσκευή PCR. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται, περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Πρόγραμμα σε μηχανήμα PCR για την εισαγωγή των προαναφερθέντων σημειακών μεταλλάξεων στο μόριο της αποA-I.

Βήμα	Θερμοκρασία και Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C για 1 min	1
Αποδιάταξη	95 °C για 50 sec	
Υβριδοποίηση	60 °C για 50 sec	18
Επιμήκυνση	68 °C για 17 min και 30 sec	
Τελική Επιμήκυνση	68 °C για 7 min	1
Σταθεροποίηση	4 °C	∞

Μετά το τέλος της αντίδρασης, στο μείγμα προστίθεται 1 μL περιοριστικού ενζύμου Dpn I. Το μείγμα αναδεύεται ελαφρά και επωάζεται για 1 h, στους 37 °C. Στη συνέχεια, 45μL υπερεπιδεκτικών κυττάρων XL10-Gold μετασχηματίζονται με την προσθήκη 2 μL προϊόντος PCR, παρουσία 2 μL β-μερκαπτοαιθανόλης (βλ. παρ. 3.9.2). Οι αποικίες που προκύπτουν από τον μετασχηματισμό των κυττάρων XL10-Gold με τον μεταλλαγμένο πλασμιδιακό φορέα χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωσή του με τη δοκιμασία mini-prep. Η επιτυχία της εισαγωγής των μεταλλάξεων στην αλληλουχία της αποA-I στον φορέα pET32a-αποA-I3C ελέγχεται με αλληλούχιση (sequencing).

3.12 Έκφραση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης A-I, αποA-I, σε βακτηριακά κύτταρα

3.12.1 Βακτηριακά επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* BL21-Gold(DE3)

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση και παραγωγή της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αποA-I άγριου τύπου, καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών της είναι η επιδεκτική σειρά βακτηριακών κυττάρων BL21-Gold(DE3) (Agilent Technologies). Τα στελέχη BL21-Gold είναι ιδανικά για μελέτες

έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτηριακά συστήματα που χρησιμοποιούν τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης, για άμεση και σε υψηλά επίπεδα έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Επιπλέον, προερχόμενα από την *Escherichia coli* B (*E.coli*) στερούνται φυσικά, αλλά και μηχανικά σχεδιασμένα την έκφραση των πρωτεασών Lon και OmpT, αντίστοιχα, οι οποίες θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν τις εκφρασμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Επίσης, είναι αρκετά επιδεκτικά στον μετασχηματισμό τους με πλασμιδιακά μόρια και στερούνται του γονιδίου που κωδικοποιεί για την ενδονουκλεάση I (*endA*), η οποία γρήγορα αποικοδομεί πλασμιδιακά μόρια που ανακτώνται από διαδικασίες απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (mini-prep procedures)⁴.

3.12.2 Σύστημα βακτηριακής έκφρασης πρωτεϊνών pET

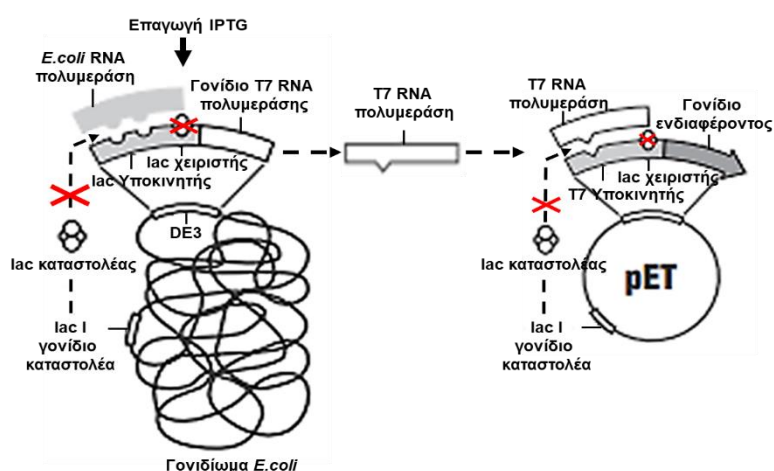
Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα BL21-Gold(DE3) πραγματοποιήθηκε με το σύστημα έκφρασης pET (pET expression system). Οι πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης pET επιτρέπουν τη γρήγορη και σε υψηλή απόδοση παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης⁵. Τα γονίδια επιλογής που κλωνοποιούνται σε πλασμιδιακούς φορείς pET βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7, ο οποίος αναγνωρίζεται ειδικά από την T7 RNA πολυμεράση του βακτηριοφάγου T7. Καθοδικά της περιοχής του υποκινητή T7 βρίσκεται μία ρυθμιστική περιοχή DNA, η οποία ονομάζεται χειριστής του οπερονίου της λακτόζης, καθώς και η περιοχή του πολυσυνδέτη, όπου κλωνοποιείται το γονίδιο επιλογής. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των φορέων αυτών είναι πως περιέχουν το ρυθμιστικό γονίδιο *lacI*, το οποίο οδηγεί στην έκφραση της πρωτεΐνης καταστολέα *lac*. Η πρωτεΐνη καταστολέας *lac* προσδένεται ισχυρά στον χειριστή και αναστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου επιλογής. Επιπλέον, οι συγκεκριμένοι φορείς διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και μία περιοχή έναρξης της μεταγραφής^[317].

Για την έκφραση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος που βρίσκονται κλωνοποιημένες στον πλασμιδιακό φορέα pET απαιτείται η ύπαρξη της T7 RNA πολυμεράσης και η αποσύνδεση της πρωτεΐνης καταστολέα *lac* από τον χειριστή.

⁴ Agilent Technologies, Instruction manual revision B, 2010: <http://www.chemagilent.com/pdf/strata/230130.pdf>

⁵ Novagen, pET System Manual 10th edition, 2003: http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Expression_Systems/NovagenPETSystemManual.pdf

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση έχει εισέλθει με μεθόδους γενετικής μηχανικής στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, BL21-Gold(DE3), υπό τον έλεγχο του οπερονίου της λακτόζης. Όταν, λοιπόν, στο θρεπτικό υλικό υπάρχει μόνο λακτόζη ή ανάλογα αυτής, όπως το ισοπροπυλο β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG), τότε το ίδιο το μόριο, που έχει συγγένεια πρόσδεσης με την πρωτεΐνη καταστολέα lac, προσδέεται σε αυτήν και δεν της επιτρέπει να προσδεθεί στον χειριστή. Οπότε, η RNA πολυμεράση είναι ελεύθερη να μεταγράψει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, όπου στη συνέχεια θα προσδεθεί στον υποκινητή της στο φορέα pET και θα μεταγράψει τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος. Άρα, η λακτόζη και τα ανάλογά της λειτουργούν ως επαγωγείς του οπερονίου της λακτόζης. Το πλεονέκτημα της χρήσης του IPTG ως επαγωγέα της έκφρασης είναι ότι δε μεταβολίζεται από τα κύτταρα, καθώς δεν αποτελεί υπόστρωμα για τη β-γαλακτοζιδάση, οπότε η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή εντός της βακτηριακής καλλιέργειας, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε αυξημένη έκφραση του προϊόντος επιλογής^[318,319] (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του επαγωγέα IPTG στο βακτηριακό σύστημα έκφρασης pET. (τροποποιημένη εικόνα από υποσημείωση με αριθμό 5).

3.12.3 Έκφραση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αποA-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21-Gold(DE3)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Στερεές καλλιέργειες μετασχηματισμένων κυττάρων BL21-Gold(DE3) με τους φορείς κλωνοποίησης pET32a-αποA-I3C, pET32a-αποA-I[V19L]3C,

pET32a-αποA-I[L144R]3C, pET32a-αποA-I[A164S]3C και pET32a-αποA-I[L178P]3C (βλ. παρ. 3.9.2).

- Διάλυμα LB (βλ. παρ. 3.9.2).
- Διάλυμα αμπικιλίνης (βλ. παρ. 3.9.2).
- β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 100 mM IPTG. Το διάλυμα φιλτράρεται πριν τη χρήση.
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια αυτόματων πιπετών.
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 2, 5, 10 και 25 mL (Greiner Bio-One).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon, 50 mL (Greiner Bio-One).
- Γυάλινες κωνικές φιάλες, όγκου 2 L (ILMABOR TGI).
- Κυψελίδες πολυστυρενίου (Greiner Bio-One).
- Πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου, όγκου 250 mL (Thermo Fisher Scientific).
- Φλόγιστρο.
- Κλίβανος αποστείρωσης (αυτόκαυστο) (Tuttnauer 3870 E).
- Ανακινούμενος επωαστήρας (shaking incubator, LabTECH).
- Φασματοφωτόμετρο (Helios).
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Sorvall RC5C (Du Pont Instruments), κεφαλή GSA.

Αρχή της μεθόδου

Όλα τα κύτταρα μιας αποικίας μικροοργανισμών που αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό μέσο προέρχονται από τις διαδοχικές διαιρέσεις ενός κυττάρου. Ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων σε εργαστηριακές καλλιέργειες είναι εκθετικός και ακολουθεί τα εξής στάδια: λανθάνουσα φάση, εκθετική φάση (ή φάση ανάπτυξης), στατική φάση και φάση θανάτου. Αν η αποικία των κυττάρων ή μέρος αυτής μεταφερθεί σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, η καλλιέργεια που προκύπτει είναι «καθαρή», αποτελείται δηλαδή από ένα μόνο είδος μικροοργανισμών. Ο σκοπός της δημιουργίας υγρών καλλιεργειών είναι η παραγωγή μεγαλύτερης κλίμακας προϊόντος. Η υγρή καλλιέργεια διακόπτεται συνήθως στην εκθετική ή τη στατική φάση, όπου ο ρυθμός των κυττάρων που δημιουργούνται είναι μεγαλύτερος ή ίσος του ρυθμού των κυττάρων που πεθαίνουν. Η ανάπτυξη μιας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας μετράται με τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας (OD) σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης. Η οπτική πυκνότητα, λόγω του σκεδασμού της οπτικής δέσμης από τα κυτταρικά σωματίδια, χρησιμεύει ως μέτρο του αριθμού

των κυττάρων της καλλιέργειας. Η μονάδα οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm ($OD_{600nm} = 1.0$) αντιστοιχεί σε 10^9 βακτηριακά κύτταρα ανά mL θρεπτικού υλικού.

Πειραματική διαδικασία

Για την έκφραση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, σε κύτταρα BL21-Gold(DE3), απαιτείται πρώτα ο μετασχηματισμός των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν κλωνοποιημένες τις επιθυμητές πρωτεϊνικές cDNA αλληλουχίες και η ανάπτυξη αυτών σε στερεές καλλιέργειες (βλ. παρ. 3.9.2). Αν ο μετασχηματισμός είναι επιτυχημένος, έπεται η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών μικρής κλίμακας.

Με τη βοήθεια αποστειρωμένου ακρορυγχίου επιλέγεται μία σπικτή αποικία μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων και εμβολιάζεται σε 5 mL διαλύματος LB και αμπικιλίνης 100 $\mu\text{g/mL}$ (υγρό θρεπτικό υλικό). Η καλλιέργεια επωάζεται για 3-4 h, στους 37 °C, στα 220 rpm, μέχρι να θολώσει και φυλάσσεται στους 4 °C. Την επόμενη μέρα η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 6.000 x g, για 10 min, στους 4 °C και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 5mL φρέσκου θρεπτικού υλικού. Η ποσότητα αυτή των κυττάρων χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 500 mL υγρού θρεπτικού υλικού (καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C, υπό ανακίνηση στα 220 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα του διαλύματος στα 600 nm να είναι περίπου 0,6. Στη συνέχεια, γίνεται η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη 0,5 mM IPTG στο μέσο της καλλιέργειας και η επώαση συνεχίζεται υπό τις ίδιες συνθήκες, για 2 h και 30 min. Τελικά, τα κύτταρα συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση στα 2.600 x g, για 20 min, στους 4 °C και το κυτταρικό ίζημα φυλάσσεται προσωρινά στους -80 °C.

3.13 Απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης αποA-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της

3.13.1 Απομόνωση των ανασυνδυασμένων, χιμαιρικών αποA-I από τα βακτηριακά κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21-Gold(DE3)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Applichem).
- 12 M HCl (Merck). Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH.

- NaCl (Appllichem).
- Λυσοζύμη (Appllichem).
- Μείγμα αναστολέων πρωτεασών απαλλαγμένο από EDTA (cOmplete ULTRA Tablets EDTA-free Protease Inhibitors Cocktail, Roche Life Science).
- Διάλυμα λύσης κυττάρων: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, μείγμα αναστολέων πρωτεασών απαλλαγμένο από EDTA, 0,1 mg/mL λυσοζύμη.
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon, 50 mL (Greiner Bio-One).
- Πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου χωρητικότητας 30 mL (Du Pont Instruments).
- Όργανο French Press (SLM-AMINCO, USA).
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Sorvall RC5C (Du Pont Instruments), κεφαλή SS-34.

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική French Press είναι μια από τις παλαιότερες του είδους της, για την ήπια διάρρηξη των λιπιδικών μεμβρανών των κυττάρων. Η συσκευή αποτελείται από έναν κύλινδρο, ιδιαίτερα ανθεκτικό στις πιέσεις, στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Με τη χρήση εμβόλου εφαρμόζεται πίεση και τα κύτταρα εξωθούνται, μέσω μίας βαλβίδας μικρής διατομής, υπό υψηλή πίεση (>10.000 psi). Το ρευστό δείγμα, καθώς διέρχεται από τη βαλβίδα, βιώνει διαμητική τάση πίεσης και αποσυμπίεση, προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών^[320]. Τα κυριότερα μέρη του οργάνου είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο χάλυβα για την αποφυγή μόλυνσης του δείγματος.

Πειραματική διαδικασία

Τα συλλεχθέντα ιζήματα των κυττάρων που έχουν υπερεκφράσει τις χιμαιρικές αποΑ-Ι (βλ. παρ. 3.12.3) μεταφέρονται από τους -80 °C στον πάγο και αφήνονται να ξεπαγώνουν αργά. Στη συνέχεια, κάθε ίζημα που έχει προέλθει από μία καλλιέργεια 500 mL αναδιασπείρεται σε 20 mL κρύου διαλύματος λύσης και το βακτηριακό εναιώρημα που προκύπτει λύεται με εφαρμογή πίεσης 10.000 psi, με τη χρήση της συσκευής French Press. Το λύμα των κυττάρων συλλέγεται σε σωλήνες τύπου falcon και η διαδικασία της λύσης επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά για κάθε δείγμα. Κατόπιν, το ομογενοποίημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 17.000 x g, για 2 h, στους 4 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, συλλέγεται το

υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το κλάσμα της διαλυτής χιμαιρικής πρωτεΐνης και φυλάσσεται προσωρινά στους 4 °C. Το ίζημα, που περιέχει το αδιάλυτο κλάσμα της πρωτεΐνης (inclusion bodies), αναδιαλύεται σε 2-3 mL διαλύματος λύσης και φυλάσσεται επίσης στους 4 °C. Επιπλέον, συλλέγεται δείγμα από το λύμα των κυττάρων, το υπερκείμενο και το αναδιαλυμένο ίζημα, ώστε να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% v/v ακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

3.13.2 Καθαρισμός των ανασυνδυασμένων, χιμαιρικών πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Διάλυμα ρητίνης νικελίου-νιτριλοτριοξικού οξέος (Ni²⁺-nitrilotriacetic acid, Ni²⁺-NTA) διαλυμένο 1:1 v/v σε 15% αιθανόλη (Agarose Bead Technologies ABT).
- Ιμιδαζόλιο (Sigma-Aldrich).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, pH 8,0.
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης της στήλης: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο, pH 8,0.
- Ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, ιμιδαζόλιο συγκέντρωσης 150, 300, 500, και 1.000 mM, pH 8,0.
- Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0.
- Χρωματογραφική στήλη, όγκου πλήρωσης 30 mL.
- Μembrάνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους 12 kDa (Sigma-Aldrich).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon, 15 και 50 mL (Greiner Bio-One).

Αρχή της μεθόδου

Η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, για τον καθαρισμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων που εμφανίζουν συγγένεια με μεταλλικά ιόντα. Τα μέταλλα ακινητοποιούνται σε μία μήτρα με τον σχηματισμό χηλικών συμπλόκων. Αμινοξέα, όπως η ιστιδίνη και η κυστεΐνη σχηματίζουν σύμπλοκα με τα χηλιωμένα μέταλλα σε ουδέτερο pH και η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε ιστιδίνες ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής σε ένα χηλιωμένο μέταλλο^[321]. Αυτό το είδος χρωματογραφίας είναι ιδανικό για τον καθαρισμό πρωτεϊνών που φέρουν ετικέτα έξι ιστιδινών.

Συγκεκριμένα, στη χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου, το Ni^{2+} αλληλεπιδρά με το νιτριλοτριοξικό οξύ, που είναι ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια αγαρόζης, σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, πρωτεΐνες που φέρουν ετικέτα έξι ιστιδινών (6x His-tag), αλληλεπιδρούν πολύ ισχυρά με τα ιόντα Ni^{2+} , μέσω των ιμιδαζολικών δακτυλίων της ιστιδίνης, επειδή στο αλκαλικό περιβάλλον τα κατάλοιπα της ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά, σχηματίζοντας έναν δακτύλιο που περιβάλλει τα κατιόντα του νικελίου^[322]. Η έκλυση πραγματοποιείται εύκολα, είτε με τη μείωση του pH του διαλύματος, είτε με τη χρήση διαλυμάτων αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους της ιστιδίνης για πρόσδεση στα ιόντα Ni^{2+} , απελευθερώνοντας τις προσδεμένες πρωτεΐνες^[323].

Πειραματική διαδικασία

Στο διαλυτό κλάσμα του λύματος των βακτηριακών κυττάρων, που έχουν εκφράσει τις χιμαιρικές πρωτεΐνες, προστίθεται διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 M ιμιδαζολίου, pH 8,0, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ιμιδαζολίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα να είναι 10 mM (διάλυμα πρόσδεσης). Στη συνέχεια, το διάλυμα της πρωτεΐνης, που έχει προέλθει από δύο καλλιέργειες 500 mL, αναμειγνύεται με 3,5 mL Ni^{2+} -NTA (1 mL διαλύματος ρητίνης Ni^{2+} -NTA απαιτείται για την πρόσδεση 4 mg πρωτεΐνης), το οποίο έχει εξισορροπηθεί με το διάλυμα πρόσδεσης. Η επώαση της πρωτεΐνης με τη ρητίνη διεξάγεται στους 4 °C, για 16-18 h, υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί η πλήρωση άδειας χρωματογραφικής στήλης με το μείγμα ρητίνης/πρωτεΐνης και συλλέγεται το διάλυμα που διέρχεται από τη στήλη (flow-through). Το διάλυμα flow-through διέρχεται για άλλη μία φορά από τη στήλη και αποθηκεύεται στους 4 °C. Στη συνέχεια, η στήλη εκπλένεται με 500 mL διαλύματος 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM ιμιδαζολίου, pH 8,0 και η έκλυση της χιμαιρικής πρωτεΐνης, που έχει προσδεθεί στη ρητίνη, επιτυγχάνεται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου στην περιοχή συγκεντρώσεων 150-1.000 mM. Για τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο έκλυσης. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με 10 mL ρυθμιστικών διαλυμάτων 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, που περιείχαν συγκεντρώση ιμιδαζολίου 150, 300, 500 και 1.000mM, αντίστοιχα. Τα διαλύματα έκλυσης συλλέγονται υπό ψύξη σε κλάσματα των 3-3,5 mL και φυλάσσονται προσωρινά στους 4 °C. Από

κάθε κλάσμα λαμβάνεται δείγμα, ώστε να αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου^[324,325].

Τα κλάσματα έκλυσης που περιέχουν τις καθαρές χιμαιρικές πρωτεΐνες, όπως διαπιστώνεται από την ανάλυσή τους σε πηκτική 15% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, συλλέγονται μαζί και μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδωσης. Ακολουθεί διαπίδωση του πρωτεϊνικού διαλύματος έναντι ρυθμιστικού διαλύματος για 14-16 h, στους 4 °C. Στη συνέχεια, γίνονται άλλες δύο αλλαγές του διαλύματος διαπίδωσης εντός 24 h, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από το πρωτεϊνικό διάλυμα. Μετά το πέρας της διαπίδωσης, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Bradford^[326] και φυλάσσεται στους 4 °C.

3.13.3 Αντίδραση πέψης της ετικέτας Trx-His από τις χιμαιρικές πρωτεΐνες με τη χρήση της πρωτεάσης His-3C

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Διάλυμα His-3C πρωτεάσης (1,3 mg/mL, ενεργότητας 1/100 w/w His-3C πρωτεάση/ συντηγμένη πρωτεΐνη).
- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα DTT 100 mM.

Αρχή της μεθόδου

Η πρωτεάση 3C αναγνωρίζει την πεπτιδική αλληλουχία NH₂-Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro-COOH και υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ της γλουταμίνης (Gln) και της γλυκίνης (Gly). Όπως αναφέρθηκε, οι ανασυνδρασμένες χιμαιρικές αποΑ-I (βλ. παρ. 3.10) φέρουν την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση 3C ανοδικά της αλληλουχίας της αποΑ-I και μετά την ετικέτα Trx-His^[312]. Οπότε, η αντίδραση πέψης της χιμαιρικής πρωτεΐνης με την πρωτεάση His-3C οδηγεί στην παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, της αλληλουχίας της αποΑ-I (28 kDa) απαλλαγμένης από την ετικέτα Trx-His (18 kDa).

Πειραματική διαδικασία

Στο διάλυμα των χιμαιρικών πρωτεϊνών προστίθεται η πρωτεάση His-3C σε αναλογία 1:100 w/w πρωτεάσης: Trx-πρωτεΐνης και DTT, σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιείται στους 4 °C, για 16 h.

3.13.4 Απομόνωση της τμημένης αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ουρία (Applichem).
- Διάλυμα ρητίνης νικελίου-νιτριλοτριοξικού οξέος (Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid, Ni^{2+} -NTA), διαλυμένο 1:1 v/v σε 15% αιθανόλη (Agarose Bead Technologies ABT).
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 M ιμιδαζόλιο, pH 8,0.
- Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, pH 8,0.
- Όξινο Ανθρακικό αμμώνιο (NH_4HCO_3) (Riedel de Haen).
- Διάλυμα διαπίδυσης: 5 mM NH_4HCO_3 .
- Χρωματογραφική στήλη, όγκου πλήρωσης 30mL.
- Μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους 12 kDa (Sigma-Aldrich).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon, 50 mL (Greiner Bio-One).

Αρχή της μεθόδου

Μετά την πέψη της ετικέτας Trx-His, αναμένεται να δεθεί στο Ni^{2+} η His-3C πρωτεάση, η ετικέτα Trx-His και τυχόν άτημη χιμαιρική πρωτεΐνη (βλ. παρ. 3.13.2), ενώ στο διάλυμα διέλευσης θα υπάρχει καθαρή η τμημένη αποΑ-I.

Πειραματική διαδικασία

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης πέψης με την πρωτεάση His-3C, στο διάλυμα της αντίδρασης προστίθεται ουρία σε τελική συγκέντρωση 6 M και αφήνεται για 1 h, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα που έχει προέλθει από δύο καλλιέργειες 500 mL επωάζεται με 2 mL Ni^{2+} -NTA, το οποίο έχει εξισορροπηθεί με το διάλυμα πρόσδεσης για 2 h, στους 4 °C, υπό ανακίνηση. Η ρητίνη μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη και συλλέγεται το διάλυμα διέλευσης που περιέχει την αποΑ-I, απαλλαγμένη από την ετικέτα Trx-His. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη δύο φορές, με 1 και 0,5 mL Ni^{2+} -NTA, για 1 h και 30 min, αντίστοιχα. Τα προσδεδεμένα στη στήλη μόρια εκκλούνται με τη χρήση

διαλύματος 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 M ιμιδαζολίου, pH 8,0 και γίνεται ανάκτηση της ρητίνης Ni²⁺-NTA. Από τα παραπάνω διαλύματα λαμβάνεται δείγμα για την ανάλυσή του με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Το τελικό διάλυμα διέλευσης που περιέχει την πρωτεΐνη απαλλαγμένη από το σύντηγμα υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 5 mM NH₄HCO₃ στους 4 °C, για 14-16 h. Γίνονται άλλες δύο αλλαγές του διαλύματος εντός 24 h. Μετά τη διαπίδυση, το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου falcon και ψύχεται υπό κλίση στους -80 °C. Τελικά, το διάλυμα λυοφιλοποιείται και η σκόνη της πρωτεΐνης φυλάσσεται στους -80 °C.

3.14 Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεάσης 3C-His

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pET-24/His-3C που φέρει τη cDNA αλληλουχία της πρωτεάσης His-3C δόθηκε γενναιόδωρα από τον Dr. Arie Geerloff (EMBL, Χαϊδελβέργη, Γερμανία). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την έκφραση, την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεάσης είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε στις παραγράφους 3.12 και 3.13, με ορισμένες τροποποιήσεις.

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Καναμυκίνη (Applichem).
- Διάλυμα 50 mg/mL καναμυκίνης. Το διάλυμα φιλτράρεται πριν τη χρήση.
- Tween-20 (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα λύσης κυττάρων: 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, μείγμα αναστολέων πρωτεασών απαλλαγμένο από EDTA (cOmplete ULTRA Tablets EDTA-free Protease Inhibitors Cocktail, Roche Life Science), 20 mM ιμιδαζόλιο, 0,2% v/v Tween-20, pH 7,5.
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης της στήλης: 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο, pH 7,5.
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 500 mM ιμιδαζόλιο, pH 7,5.
- Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης: 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5.
- Γλυκερόλη (Applichem).
- Τα επιπλέον υλικά που απαιτούνται για τη διαδικασία είναι όμοια με αυτά των παραγράφων 3.12.3 και 3.13.

Αρχή της μεθόδου

Οι μέθοδοι έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού της πρωτεάσης His-3C έχουν αναλυθεί στις παραγράφους 3.12 και 3.13.

Πειραματική διαδικασία

Τα βακτηριακά κύτταρα έκφρασης BL21-Gold(DE3) μετασχηματίζονται (βλ. παρ. 3.9.2) με τον πλασμιδιακό φορέα pET-24/His-3C, ο οποίος φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι του αντιβιοτικού καναμυκίνη, και επιστρώνονται σε τρυβλία LB-άγαρ που περιέχουν καναμυκίνη 50 µg/mL. Ακολουθεί η ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας μικρής κλίμακας στους 37 °C, στα 220 rpm, για 14-16 h και την επόμενη ημέρα η αναπυγμένη καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 500 mL διαλύματος LB-καναμυκίνης 50 µg/mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται μέχρι η οπτική πυκνότητα του διαλύματος στα 600 nm να είναι 0,6 και η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης γίνεται με την προσθήκη 0,5 mM IPTG στο μέσο της καλλιέργειας για 16 h, στους 30 °C, υπό ανακίνηση στα 220 rpm. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται και το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε 20 mL διαλύματος λύσης. Τα κύτταρα λύνονται με τη συσκευή French Press και το λύμα αυτών φυγοκεντρείται στα 17.000 x g, για 2 h, στους 4 °C. Στο υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει το διαλυτό κλάσμα της πρωτεάσης His-3C προστίθενται 2 mL Ni²⁺-NTA και το μείγμα επωάζεται για 1h, στους 4 °C, υπό ήπια ανάδευση. Το μείγμα ρητίνης/πρωτεΐνης μεταφέρεται σε άδεια χρωματογραφική στήλη και συλλέγεται το διάλυμα διέλευσης. Η στήλη εκπλένεται με 240 mL διαλύματος έκπλυσης και η πρωτεΐνη εκκλούεται με 16 mL διαλύματος έκλουσης. Τα κλάσματα έκλουσης συλλέγονται ανά 2 mL και αναλύονται σε πηκτή 12% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Αυτά που περιέχουν την καθαρή πρωτεάση 3C-His μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης και υπόκεινται σε διαπίδυση έναντι διαλύματος 50 mM Tris-HCl, 0,5 M, NaCl, pH 7,5 για τουλάχιστον 1 h, στους 4 °C. Γίνονται επιπλέον δύο αλλαγές του διαλύματος διαπίδυσης, μία εκ των οποίων είναι ολονύκτια. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεάσης με τη δοκιμασία Bradford και στο διάλυμα προστίθεται γλυκερόλη σε αναλογία 10% v/v. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

3.15 Παρασκευή και ανάλυση δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL

3.15.1 Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (reconstituted HDL, rHDL)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Χλωροφόρμιο (CHCl_3) (Applichem).
- Μεθανόλη (CH_3OH) (Sigma-Aldrich).
- 2-ολεϋλο-1-παλμιτοϋλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, POPC) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 20 mg/mL POPC σε $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 v/v (stock διάλυμα).
- Χοληστερόλη (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 2 mg/mL χοληστερόλης σε $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 v/v (stock διάλυμα).
- [4- ^{14}C]χοληστερόλη (0,1 mCi/mL, ειδική δραστικότητα 55 mCi/mmol σε αιθανόλη) (ARC). (Σημείωση: Προστίθεται μόνο στα πειράματα προσδιορισμού δραστικότητας του ενζύμου LCAT).
- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Applichem).
- NaCl (Applichem).
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (Riedel de Haen).
- 12 M HCl (Merck). Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,01% w/v EDTA, pH 8,0.
- Χολικό νάτριο (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 30 mg/mL χολικού νατρίου σε ρυθμιστικό διάλυμα (stock διάλυμα).
- Λυοφιλοποιημένες πρωτεΐνες: αποA-I άγριου τύπου, αποA-I[V19L], αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P].
- Διαλύματα πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωσης ~2 mg/ml.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1x: 0,05 M NaP.
- Κυκλοαναδευτήρας (Vortex-2 Genie, Scientific industries).
- Γυάλινα σωληνάρια.
- Οβίδα N_2 .
- Μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους 12 kDa (Sigma-Aldrich).

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου διευκολύνει την αλληλεπίδραση της αποΑ-I με μυκήλια φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης. Όταν τα χολικά άλατα και τα μυκήλια λιπιδίων αναμειχθούν, τα χολικά άλατα διαταράσσουν το πλέγμα των λιπιδίων και τα διαλυτοποιούν. Όταν η μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίων και χολικού νατρίου είναι 1:1, το μείγμα λιπιδίων-χολικού νατρίου σχηματίζει δισκοειδείς διπλοστιβάδες λιπιδίων, οι οποίες σταθεροποιούνται με τη δακτυλιοειδή τοποθέτηση μορίων χολικού νατρίου γύρω από τη διπλοστιβάδα λιπιδίων. Με τη σταδιακή απομάκρυνση, μέσω διαπίδυσης, των μορίων χολικού νατρίου από τα λιπιδίωματα επιτυγχάνεται η αντικατάσταση αυτών με την αποΑ-I, προς σχηματισμό δισκοειδών HDL σωματιδίων^[327,328].

Πειραματική διαδικασία

Η μοριακή αναλογία POPC: χοληστερόλη: αποΑ-I: χολικό νάτριο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή σωματιδίων rHDL, που περιέχουν είτε την αποΑ-I άγριου τύπου, είτε τις μεταλλαγμένες μορφές της είναι 100:10:1:100. Σε ένα τυπικό πείραμα, προστίθενται σε γυάλινο σωληνάριο 0,14 mg χοληστερόλης (από το stock διάλυμα) και 2,7 mg POPC (από το stock διάλυμα), αναμειγνύονται ήπια και ακολούθως ξηραίνονται υπό ατμόσφαιρα N₂. Τα ξηραμένα λιπίδια επαναιωρούνται σε 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,01% w/v EDTA, pH 8,0) με επαναλαμβανόμενη ήπια ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 30 sec, ακολουθούμενη από επώαση στους 4 °C, για 30 sec. Η διαδικασία ανάδευσης και επώασης του αιωρήματος επαναλαμβάνεται μέχρι πλήρους ομογενοποίησης των λιπιδίων (~1 h). Στη συνέχεια, προστίθενται 1,53 mg χολικού νατρίου (από το stock διάλυμα), το αιώρημα διαυγάζεται και επωάζεται για 1 h, στους 4 °C. Ακολουθεί η προσθήκη 1 mg αποΑ-I και η επώαση συνεχίζεται για 1 h, στους 4 °C. Η απομάκρυνση του χολικού νατρίου από το δείγμα επιτυγχάνεται μέσω διαπίδυσης έναντι ρυθμιστικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,01% w/v EDTA, pH 8,0) στους 4 °C, με τη χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν τη διέλευση μορίων μοριακής μάζας μικρότερης των 12 kDa. Η διαπίδυση διεξάγεται για 48 h, κατά τη διάρκεια των οποίων γίνονται τρεις αλλαγές του διαλύματος διαπίδυσης. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, στο δείγμα των σωματιδίων διαβιβάζεται αέριο N₂, ώστε να αποφευχθεί η οξειδωση των λιπιδίων και στη συνέχεια αποθηκεύεται στους 4°C.

Για να είναι συγκρίσιμα τα rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της, όλα τα δείγματα παρασκευάζονται από το ίδιο αιώρημα φωσφολιπιδίων-χοληστερόλης και η πειραματική διαδικασία διεξάγεται παράλληλα. Στα δείγματα που προκύπτουν προσδιορίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης με τη δοκιμάσια Lowry^[329,330], της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων που περιέχουν. Επιπλέον, για τα να διαπιστωθεί ο σχηματισμός των rHDL σωματιδίων, τα δείγματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου διαβαθμισμένης πυκνότητας^[331,332].

Για τα βιοφυσικά πειράματα, τα rHDL σωματίδια, μετά τον σχηματισμό τους, υπόκεινται εκτενή διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων. Για τα πειράματα προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου LCAT, η χοληστερόλη σημαίνεται με [¹⁴C]χοληστερόλη, σε αναλογία 5.000-7.000 κρούσεων (counts per minute, cpm) ανά nmole μη σημασμένης χοληστερόλης.

3.15.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης φωσφολιπιδίων

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- rHDL σωματίδια.
- Εμπορικά διαθέσιμο κιτ προσδιορισμού της συγκέντρωσης φωσφολιπιδίων, (Sentinel Diagnostics), που περιέχει:
 - Βαθμονομητής Πρότυπος Ορός: Λυοφιλοποιημένος ορός ανθρώπινης προέλευσης που περιέχει γνωστές συγκεντρώσεις λιπιδίων. Η ανασύσταση του βαθμονομητή γίνεται με την προσθήκη 3 mL H₂O. Η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων είναι 274 mg/dL.
 - Αντιδραστήριο 1a (R1a): 50 mmol/L N-[τρις(υδροξυμεθυλ)μεθυλ]-2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ (TES), pH 7,6, 1,3 mmol/L EDTA, 12 mmol/L 4-ύδροξυβενζοϊκό οξύ, επιφανειοδραστικοί παράγοντες, <0,1% νατραζίδιο. Διατηρείται στους 4 °C.
 - Αντιδραστήριο 1b (R1b) (Λυοφιλοποιημένο): 50 mmol/L TES, >1.500 U/l φωσφολιπάση D, >7.500 U/mL οξειδάση της χολίνης, >7.000 U/mL υπεροξειδάση, 1,2 mmol/L 4-αμινοαντιπυρίνη.
- Διάλυμα R1: 10 mL αντιδραστηρίου R1a προστίθενται σε 1 φιαλίδιο αντιδραστηρίου R1b. Το μείγμα αφήνεται για 10 min και στη συνέχεια γίνεται ήπια ανακίνησή του. Διατηρείται στους 4 °C, για 14 μέρες.

- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-one).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200).

Αρχή της Μεθόδου

Η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων προσδιορίζεται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, τα φωσφολιπίδια, όπως η φωσφατιδυλοχολίνη, η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη, υδρολύονται παρουσία της φωσφολιπάσης D σε χολίνη και φωσφατιδικό οξύ ή λυσοφωσφατιδικό οξύ ή N-ακυλο-σφιγγο-φωσφορικό οξύ, αντίστοιχα. Η χολίνη οξειδώνεται από την οξειδάση της χολίνης σε βεταΐνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂). Τελικά, το H₂O₂ αντιδρά 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 θερμαίνονται στους 37 °C. Σε πλακίδιο 96 φρεατίων αναμειγνύονται 5 μL δείγματος σε τελικό όγκο 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος (του εκάστοτε δείγματος) με 300 μL διαλύματος R1. Στη συνέχεια, το πλακίδιο επωάζεται στους 37 °C, για 10 min και η απορρόφηση μετράται στα 505 nm. Παράλληλα, κατάλληλοι όγκοι διαλύματος του βαθμονομητή πρότυπου ορού (τελική ποσότητα φωσφολιπιδίων ανά φρεάτιο: 2,74, 5,48, 10,96, 16,44 και 27,4 μg) προστίθενται σε τελικό όγκο 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος και υφίστανται την ίδια κατεργασία. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος (10 μL). Η περιεχόμενη στα δείγματα ποσότητα φωσφολιπιδίων υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

3.16 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου LCAT

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- rHDL σωματίδια επισημασμένα με [4-¹⁴C]χοληστερόλη, που περιέχουν την αποA-I άγριου τύπου ή την αποA-I[V19L] (βλ. παρ. 3.15.1).
- Χοληστερόλη (Sigma-Aldrich).
- Ολεϊκός εστέρας χοληστερόλης (Sigma-Aldrich).
- Αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin, BSA) (Sigma-Aldrich).

- Διάλυμα 40 mg/mL BSA σε H₂O.
- Διάλυμα 14 M 2-μερκαπτοαιθανόλης (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 100 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης σε H₂O.
- Ακυλο-τρανσφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase, LCAT) (ανασυνδυασμένη LCAT ανθρώπου) σε τέτοια αραιώση, η οποία οδηγεί σε 5-10% ολοκλήρωσης της αντίδρασης.
- Διάλυμα εσωτερικών προτύπων (carrier solution): 5 mg χοληστερόλης και 5 mg ολεϊκού εστέρα χοληστερόλης σε 1 mL CHCl₃-CH₃OH 2:1 v/v.
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃) (Applichem).
- Μεθανόλη (CH₃OH) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα τερματισμού (stop solution): 40 μL διαλύματος carrier solution σε 5 mL CHCl₃-CH₃OH 2:1 v/v.
- Πετρελαϊκός αιθέρας (Applichem).
- Αιθυλεθέρας (Sigma-Aldrich).
- Οξικό οξύ (CH₃COOH) (Applichem).
- Ιώδιο (Applichem).
- Υγρό σπινθηρισμού 11 g PPO (2,5-διφαινυλοξαζόλιο) (Sigma-Aldrich), 0,2 g POPOP (1,4-δισ(5-φαινυλοξαζολ-2-υλο)βενζόλιο) (Fluka), 1.266 mL τολουόλιο (Sigma-Aldrich). Αυτά τα τρία συστατικά επωάζονται όλη νύχτα και την επόμενη μέρα προστίθενται 660 mL Triton X-100.
- Χρωματογραφική πλάκα ITLC (polysilica acid gel impregnated glass fiber sheets) (Pall Corporation).
- Κυκλοαναδευτήρας (Rx³ Velp Scientifica).
- Γυάλινα σωληνάρια.
- Πιπέττες παστέρ.
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Scientific).
- Οβίδα N₂.
- Απαγωγός.
- Πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας, όγκου 20mL (Bioline).
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β⁻ ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

Αρχή της Μεθόδου

Η LCAT είναι υπεύθυνη για την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης, μεταφέροντας μακριάς αλυσίδας ελεύθερα λιπαρά οξέα από τη θέση 2 της φωσφατιδυλοχολίνης στην υδροξυλομάδα του μορίου της χοληστερόλης. Αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα κυρίως στην επιφάνεια των HDL και σε μικρότερο βαθμό στις LDL και VLDL^[328].

Πειραματική διαδικασία

Σε γυάλινα σωληνάρια προστίθενται αυξανόμενες ποσότητες rHDL σωματιδίων (0,0007, 0,001, 0,0015, 0,002, 0,004, 0,008, 0,016, 0,032 mg ως προς την αποΑ-I), 50 μ L διαλύματος 40 mg/mL BSA και 20 μ L διαλύματος 100 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 500 μ L με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,01% w/v EDTA, pH 8,0). Το μείγμα αναμειγνύεται ισχυρά και επωάζεται στους 37 °C, για 30 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 25 μ L δείγματος LCAT και η επώαση συνεχίζεται για επιπλέον 30 min. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 5 mL διαλύματος τερματισμού. Το μείγμα αναμειγνύεται ισχυρά και μεταφέρεται στους 4 °C, για τουλάχιστον 40 min, ώστε να διαχωριστεί η οργανική από την υδατική φάση. Η υδατική φάση απομακρύνεται με πιπέττα παστέρ και η οργανική φάση ξηραίνεται υπό αέριο N₂. Τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε 500 μ L χλωροφορμίου, αναμειγνύονται ισχυρά (vortex) και κατόπιν ξηραίνονται υπό αέριο N₂. Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 70 μ L χλωροφορμίου και τοποθετείται σε χρωματογραφική πλάκα ITLC, που έχει ξηρανθεί στους 110 °C, για 30 min. Η πλάκα αναπτύσσεται για περίπου 5 min, σε διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα: αιθυλεθέρα: οξικού οξέος (85:15:1 v/v) σε χρωματογραφικό θάλαμο. Οι ζώνες της εστεροποιημένης χοληστερόλης (CE) και της ελεύθερης χοληστερόλης (FC) εμφανίζονται με έκθεση σε ατμούς ιωδίου για 10-20 sec. Οι θέσεις των FC και CE σημειώνονται με μολύβι και το κίτρινα χρωματισμένο ιώδιο αφήνεται να εξαχνωθεί μέχρι την πλήρη εξαφάνιση της χρώσης. Τότε, οι ζώνες των FC και CE κόβονται χωριστά και τοποθετούνται σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας, που περιέχουν 10 mL υγρό σπινθηρισμού. Ακολουθεί επώαση 30 min, ώστε τελικά να επιτευχθεί η πλήρης αποσύνδεση των λιπιδίων από το υλικό της χρωματογραφικής πλάκας και μέτρηση της ραδιενέργειας σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

Στη συνέχεια, υπολογίζεται η ταχύτητα της αντίδρασης, η οποία εκφράζεται σε nmol εστέρων χοληστερόλης (CE) που παράγονται ανά ώρα, με την εξίσωση: $V(nmol\ CE/h) = ((\alpha \times 0,14/386,7) \times (cpm\ CE/cpm\ (CE + C))) \times 1.000.000/0,5$, όπου α: τα mg της αποΑ-I στην αντίδραση, 0,14: τα mg της χοληστερόλης που περιέχονται στα rHDL σωματίδια ανά 1 mg αποΑ-I, 386,7: το μοριακό βάρος της χοληστερόλης (g/mol), CE: οι εστέρες χοληστερόλης, C: η χοληστερόλη και 0,5: η διάρκεια της αντίδρασης σε h. Κατόπιν, η ταχύτητα της αντίδρασης παρίσταται γραφικά συναρτήσει της συγκέντρωσης της αποΑ-I και τα δεδομένα προσαρμόζονται σε κινητική Michaelis-Menten. Οι φαινόμενες σταθερές K_{Mapp} (φαινόμενη σταθερά Michaelis-Menten) και V_{maxapp} (η φαινόμενη μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης) υπολογίζονται από την καμπύλη Michaelis-Menten, χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism. Η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση: V_{maxapp}/K_{Mapp} και εκφράζεται σε nmol CE/h/μM αποΑ-I^[160,328].

3.17 Μέτρηση ραδιενέργειας μέσω σπινθηρισμού υγρών

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ραδιενεργά δείγματα.
- Υγρό σπινθηρισμού (βλ. παρ. 3.16).
- Πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας, όγκου 20 mL (Bioline).
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β⁻ ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

Αρχή της Μεθόδου

Η μέτρηση της ραδιενέργειας γίνεται με την τεχνική σπινθηρισμού υγρών (liquid scintillation counting), στην οποία η ραδιενεργή ακτινοβολία μετράται δευτερογενώς. Το ραδιενεργό δείγμα που περιέχει κάποιο ισότοπο (³H, ¹⁴C), το οποίο εκπέμπει β⁻ σωματίδια, αναμειγνύεται με ένα «κοκτέιλ» σπινθηρισμού. Το «κοκτέιλ» αυτό περιέχει: α) τον διαλύτη (S, τολουόλιο), που απορροφά μέρος της ακτινοβολίας των εκπεμπόμενων β⁻ σωματιδίων και διεγείρεται, β) τον πρωταρχικό σπινθηριστή, που είναι μια φθορίζουσα ουσία (F₁, PPO), στην οποία μεταφέρεται η διέγερση του διαλύτη και γ) έναν δευτερεύοντα σπινθηριστή (F₂, POPOP), ο οποίος απορροφά την ακτινοβολία που εκπέμπει ο πρωταρχικός σπινθηριστής και εκπέμπει φωτόνια μεγαλύτερου μήκους κύματος, τα οποία ανιχνεύονται καλύτερα

από τον φωτοπολλαπλασιαστή του ειδικού θαλάμου μέτρησης ραδιενέργειας. Τελικά, η ακτινοβολία αποδιέγερσης των φθορίζουσών ουσιών, που ανιχνεύεται και η οποία είναι ανάλογη προς την ενέργεια των β⁻ σωματιδίων που απορροφήθηκε, καταγράφεται ως ο αριθμός των κρούσεων ανά λεπτό (cpm)^[333].

Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας που περιέχουν 5-10 mL υγρό σπινθηρισμού προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα του υπό μέτρηση δείγματος, ακολουθεί ανάδευση και μετράται η ραδιενέργεια στον μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

3.18 Βιοφυσική ανάλυση της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της

3.18.1 Προετοιμασία των δειγμάτων της αποΑ-I

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Υδροχλωρική γουανιδίνη, GndHCl (Applichem).
- DPBS 10x (Lonza).
- Διάλυμα 8 M GndHCl σε DPBS 1x.
- Δις αποσταγμένο (dd) H₂O.
- Μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους 12 kDa (Sigma-Aldrich).
- Μαγνητικός αναδευτήρας (LabTECH).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).
- Φασματοφωτόμετρο (Nanodrop, ND-1000).
- Φασματοφωτόμετρο (Helios).

Αρχή της Μεθόδου

Οι πρωτεΐνες που αναλύονται με βιοφυσικές μεθόδους πρέπει να έχουν υψηλό βαθμό καθαρότητας, να μην περιέχουν προσμείξεις νουκλεϊνικών οξέων, καθώς και να διατηρούνται διαλυμένες σε αραιές συγκεντρώσεις, σε υδατικά διαλύματα χαμηλής περιεκτικότητας αλάτων, ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία συσσωματωμάτων^[334]. Πρωτεΐνες, όπως η αποΑ-I, που φέρουν χαρακτηριστικά «τηγμένης σφαιρικής» (“molten globule”) πρωτεΐνης, συχνά σχηματίζουν πολυπρωτεϊνικά συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα^[72]. Στην παρούσα

εργασία, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης αποφεύγεται με την αποδιάταξη της αποΑ-I παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης και κατόπιν απομάκρυνση της υδροχλωρικής γουανιδίνης και αναδιάταξη της πρωτεΐνης σε χαμηλή συγκέντρωση.

Η υδροχλωρική γουανιδίνη είναι ένας ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας, που έχει την ικανότητα να διασπά τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, διαταράσσοντας τις αλληλεπιδράσεις σύνδεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου, γέφυρες άλατος και μη πολικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Δεδομένου ότι η αντίδραση αποδιάταξης δεν είναι αρκετά ισχυρή, ώστε να διασπάσει τους πεπτιδικούς δεσμούς, η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης παραμένει αναλλοίωτη. Με την αργή απομάκρυνση του αποδιατακτικού παράγοντα (GndHCl) από το πρωτεϊνικό διάλυμα, μέσω της διαπίδυσης, τα πρωτεϊνικά μόρια επαναδιατάσσονται, ανακτώντας την εγγενή διαμόρφωσή τους στο χώρο. Τυχόν μόρια πρωτεΐνης που δεν έχουν επαναδιαταχθεί, είναι ασταθή, συσσωματώνονται, καταβυθίζονται και τελικά απομακρύνονται με τη μορφή ίζηματος, μέσω φυγοκέντρησης^[335,336].

Πειραματική διαδικασία

Πριν από όλες τις αναλύσεις, τα λυοφιλοποιημένα αποθέματα της αποΑ-I άγριου τύπου ή των μεταλλαγμένων μορφών διαλύονται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος 8 M GndHCl, ώστε η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης να είναι 0,2 mg/ml. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά (Nanodrop) στα 280 nm. Τα δείγματα αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης επωάζονται για 1 h, σε θερμοκρασία δωματίου και υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι διαλύματος DPBS 1x, στους 4 °C, για 14-16 h. Στη συνέχεια, γίνονται άλλες δύο αλλαγές του διαλύματος διαπίδυσης μέσα σε 24 h, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της GndHCl από το πρωτεϊνικό διάλυμα. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στους 4 °C, για 20 min, στα 13.000 rpm, ώστε να κατακρημνιστεί τυχόν ίζημα πρωτεΐνης. Στα υπερκείμενα διαλύματα προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, λαμβάνοντας το φάσμα απορρόφησης στα 220-340 nm. Από το φάσμα που λαμβάνεται, καταγράφονται οι τιμές απορρόφησης A_{260} , A_{280} και A_{320} . Η απορρόφηση στα 280 nm οφείλεται στην απορρόφηση των καταλοίπων θρυπτοφάνης και τυροσίνης. Από την τιμή A_{280} αφαιρείται η τιμή A_{320} , που αντιστοιχεί στην απορρόφηση τυχόν προσμείξεων ή πρωτεϊνικών

συσσωματωμάτων. Η συγκέντρωση υπολογίζεται βάσει του νόμου Lambert-Beer ($A = \varepsilon \cdot l \cdot c$, όπου A: απορρόφηση στα 280 nm, ε : συντελεστής γραμμομοριακής απορρόφησης, $(\text{mg/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l: μήκος οπτικής διαδρομής, cm και c: συγκέντρωση πρωτεΐνης, mg/mL). Ο συντελεστής γραμμομοριακής απορρόφησης για την αποΑ-I άγριου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές της υπολογίζεται με τη χρήση του προγράμματος ProtParam (www.expasy.org) ($\varepsilon_{\text{αποΑ-I}} = 1,143 (\text{mg/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{αποΑ-I[V19L]}} = 1,141 (\text{mg/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{αποΑ-I[L144R]}} = 1,141 (\text{mg/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{αποΑ-I[A164S]}} = 1,142 (\text{mg/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ και $\varepsilon_{\text{αποΑ-I[L178P]}} = 1,142 (\text{mg/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Επίσης, για κάθε πρωτεΐνη υπολογίζεται ο λόγος A_{260}/A_{280} , που δηλώνει τις προσμείξεις DNA στο δείγμα (σε καθαρά δείγματα πρωτεϊνών $A_{260}/A_{280} \approx 0,6$). Οι πρωτεΐνες διατηρούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($\sim 0,1 \text{ mg/ml}$) στους 4 °C, για να αποφευχθεί τυχόν συσσωμάτωση.

3.18.2 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας της αποΑ-I με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

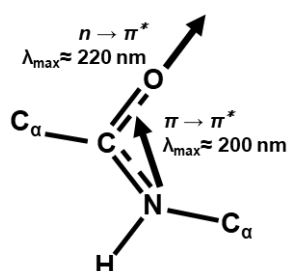
- Κυψελίδα χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1mm (Hellma Analytics).
- Φασματοπολωσίμετρο (Jasco-715).
- Θερμοστάτης (Jasco PTC-348WI Peltier).

Αρχή της Μεθόδου

Το φως χαρακτηρίζεται από χρονοεξαρτώμενα ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Αν μια δέσμη φωτός διέλθει μέσα από κατάλληλα πρίσματα ή φίλτρα, τότε το φως πολώνεται και το ηλεκτρικό του πεδίο ταλαντεύεται ημιτονοειδώς σε ένα μόνο επίπεδο. Το επίπεδα πολωμένο φως μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες ίσου πλάτους ταλάντωσης, οι οποίες βρίσκονται στην ίδια φάση και το διάνυσμα της έντασης του ηλεκτρικού τους πεδίου (E) περιστρέφεται προς δύο αντίρροπες κατευθύνσεις, δεξιόστροφα (E_R) και αριστερόστροφα (E_L), αντίστοιχα. Όταν ασύμμετρα μόρια αλληλεπιδρούν με το επίπεδα πολωμένο φως, λόγω της ύπαρξης κυκλικής διπλοθλαστικότητας ($n_R \neq n_L$), στρέφουν το επίπεδο πόλωσης του φωτός. Ταυτόχρονα, στην περιοχή απορρόφησης, το δεξιόστροφο και αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως απορροφάται σε διαφορετικό βαθμό, δηλαδή τα διανύσματα E_R και E_L γίνονται συγχρόνως άνισα, οπότε η συνισταμένη τους διαγράφει ελλειπτική τροχιά και το φως που εξέρχεται είναι ελλειπτικά

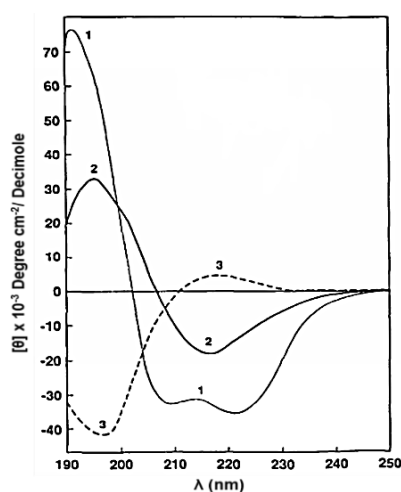
πολωμένο. Το μέτρο της διαφοράς της άνισης απορρόφησης του δεξιόστροφου από το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως ($\Delta A = A_R - A_L$) συναρτήσει του μήκους κύματος (λ) ονομάζεται κυκλικός διχρωϊσμός (circular dichroism, CD) και μετράται σε βαθμούς ελλειπτικότητας. Ως ελλειπτικότητα ορίζεται η γωνία (θ), της οποίας η εφαπτομένη είναι ο λόγος του δευτερεύοντος άξονα προς τον κύριο άξονα της έλλειψης. Η θ και η ΔA συνδέονται με τη μαθηματική σχέση: $\theta = 32,98 \cdot \Delta A$ (degrees). Το σήμα κυκλικού διχρωϊσμού που καταγράφεται πειραματικά μετατρέπεται στη μέση μοριακή ελλειπτικότητα ($[\theta]$) ανά κατάλοιπο, σύμφωνα με τον τύπο: $[\theta] = \text{Σήμα}_{CD} \cdot MB / 10 \cdot d \cdot c \cdot n$, όπου d : το μήκος της οπτικής διαδρομής (cm), c : η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα (mg/mL) και n : ο αριθμός καταλοίπων της πρωτεΐνης^[334,337].

Ο κυκλικός διχρωϊσμός είναι μια φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Στις πρωτεΐνες υπάρχουν δύο περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου παρουσιάζεται έντονη διαφορική απορρόφηση, η «εγγύς» και η «άπω» υπεριώδης. Στην εγγύς υπεριώδη περιοχή (near UV) απορροφούν οι πλευρικές αλυσίδες των αρωματικών αμινοξέων (260-320 nm), ενώ στην άπω υπεριώδη περιοχή (far UV) απορροφούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί (ασθενής απορρόφηση στα 260 nm) και κυρίως ο πεπτιδικός δεσμός (<250 nm)^[338]. Ειδικότερα, το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού μιας πρωτεΐνης στο άπω υπεριώδες (180-250 nm) αντανακλά τη διαμόρφωση του πεπτιδικού κορμού αυτής στο χώρο. Τα φάσματα των πρωτεϊνών στην περιοχή απορρόφησης 180-250 nm κυριαρχούνται από $n \rightarrow \pi^*$ και $\pi \rightarrow \pi^*$ ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις των αμιδικών ομάδων (Εικόνα 3.4)^[337,339-342]. Επειδή οι μεταπτώσεις αυτές επηρεάζονται από τη γεωμετρία του πεπτιδικού κορμού της πρωτεΐνης, τα φάσματα CD αντικατοπτρίζουν τα διαφορετικά δομικά μοτίβα της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών^[342].



Εικόνα 3.4. Διάγραμμα του πεπτιδικού δεσμού που απεικονίζει τον προσανατολισμό των δίπολων μετάπτωσης (ως βέλη) για τις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ και $\pi \rightarrow \pi^*$ ^[342].

Ποικίλες εμπειρικές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνικών φασμάτων CD έχουν αναπτυχθεί για την ποσοτική εκτίμηση του περιεχομένου της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, στηριζόμενες στο γεγονός ότι το φάσμα CD μιας πρωτεΐνης μπορεί να εκφραστεί ως η συνισταμένη των τυπικών φασμάτων των στοιχείων δευτεροταγούς δομής, με συνεισφορά του καθενός στο φάσμα ανάλογης με το ποσοστό εμφάνισής του στη δομή του πρωτεϊνικού μορίου (Εικόνα 3.5). Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούν βάσεις δεδομένων που περιλαμβάνουν φάσματα CD πρωτεϊνών, των οποίων η δομή έχει αναλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, για την προσαρμογή των προς ανάλυση φασμάτων^[342,343].



Εικόνα 3.5: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού πολυ-L-λυσίνης σε διαμορφώσεις 100% α-έλικας (καμπύλη 1), β-φύλλου (καμπύλη 2) και τυχαίου σπειράματος (καμπύλη 3)^[337].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. παρ. 1.4.3), η δευτεροταγής δομή της αποΑ-I χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό α-έλικας. Η διαμόρφωση α-έλικας εμφανίζει συγκεκριμένο φάσμα CD. Αναλυτικότερα, το φάσμα CD της α-έλικας χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας ευρείας και μεγάλης σε ένταση αρνητικής περιοχής, με δύο ελάχιστα σε μήκη κύματος 222 και 208 nm και ένα μέγιστο σε μήκος κύματος 190 nm. Η αρνητική κορυφή στα 222 nm αποδίδεται σε $n \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση^[344,345], ενώ οι κορυφές στα 208 και 190 nm αποδίδονται στην αποσύζευξη της κορυφής που οφείλεται σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση^[346]. Συγκεκριμένα, το ελάχιστο στα 208 nm οφείλεται σε μέρος της μετάπτωσης $\pi \rightarrow \pi^*$, της οποίας η πόλωση είναι παράλληλη στον άξονα της α-έλικας, ενώ το μέγιστο στα 190 nm οφείλεται σε μέρος της μετάπτωσης $\pi \rightarrow \pi^*$, της οποίας η πόλωση είναι κάθετη στον άξονα της α-έλικας. Άλλα δομικά μοτίβα δεν εμφανίζουν τέτοιο διαχωρισμό

της $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάπτωσης^[347]. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η διαμόρφωση α-έλικας είναι ιδιαίτερα ευδιάκριτη στο φάσμα CD μιας πρωτεΐνης. Συνεπώς, η φασματοσκοπία CD είναι κατάλληλη μέθοδος για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής της αποΑ-I, καθώς και για τη μελέτη αλλαγών στη δομή της αποΑ-I που τυχόν προκαλούν οι μεταλλάξεις.

Πειραματική διαδικασία

Με τη χρήση του φασματοπολωσιμέτρου Jasco-715 λαμβάνονται τα φάσματα CD των δειγμάτων της αποΑ-I στην άπω υπεριώδη περιοχή, στους 25 °C. Το όργανο είναι συνδεδεμένο με τον θερμοστάτη PTC-348WI, ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία στο θάλαμο της κυψελίδας. Χρησιμοποιείται κυψελίδα χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1 mm. Τα δείγματα αποΑ-I σε ελεύθερη λιπιδίων μορφή, καθώς και τα δείγματα λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιέχουν αποΑ-I βρίσκονται σε συγκέντρωση 0,1 mg/mL. Οι παράμετροι μέτρησης είναι οι ακόλουθες: εύρος μήκους κύματος: 195-260 nm, εύρος ζώνης: 1 nm, απόκριση: 8 sec, μέγεθος βήματος μέτρησης: 0,2 nm, ταχύτητα σάρωσης: 50 nm/min. Για κάθε πρωτεϊνικό διάλυμα λαμβάνονται τρία φάσματα και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών. Τα αποτελέσματα διορθώνονται, αφαιρώντας το υπόβαθρο απορρόφησης του ρυθμιστικού διαλύματος. Το % ποσοστό α-ελικότητας της αποΑ-I υπολογίζεται, χρησιμοποιώντας τη μέση μοριακή ελλειπτικότητα στα 208 nm και 222 nm, όπως περιγράφεται βιβλιογραφικά^[337,347], με βάση τις εξισώσεις:

$$\% \alpha\text{-helix}_{208\text{nm}} = ([\theta]_{208} - 4.000) / (33.000 - 4.000) \times 100,$$

$$\% \alpha\text{-helix}_{222\text{nm}} = ([\theta]_{222} + 3.000) / (36.000 + 3.000) \times 100, \text{ αντίστοιχα.}$$

3.18.3 Παρακολούθηση της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-I με Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

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

Αρχή της Μεθόδου

Η θερμοδυναμική σταθερότητα μιας πρωτεΐνης, καθώς και η επίδραση μιας μετάλλαξης σε αυτή μπορούν να μελετηθούν με την καταγραφή του σήματος

κυκλικού διχρωϊσμού συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι πρωτεΐνες με πλήρως διατεταγμένη διαμόρφωση, συνήθως χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη στοιχείων δευτεροταγούς δομής με υψηλή ασυμετρία, όπως α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες, των οποίων τα φάσματα CD είναι χαρακτηριστικά (βλ. παρ. 3.18.2). Κατά τη θερμική αποδιάταξη των πρωτεϊνών παρουσιάζεται απώλεια της δευτεροταγούς οργάνωσης του μορίου, οπότε το σήμα του CD μεταβάλλεται. Η μεταβολή του σήματος CD σε συγκεκριμένο μήκος κύματος συναρτήσει της θερμοκρασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων του μορίου^[348].

Πειραματική διαδικασία

Το προφίλ της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της καταγράφεται, παρακολουθώντας την αλλαγή της μοριακής ελλειπτικότητας στα 222 nm, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία σε ένα εύρος τιμών από 20 έως 80 °C. Η θερμοκρασία αυξάνεται ανά 0,2 °C, με ρυθμό μεταβολής 1 °C/min. Τα πειραματικά δεδομένα που λαμβάνονται από το CD προσαρμόζονται σε ένα μοντέλο σιγμοειδούς καμπύλης Boltzmann, χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism.

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι των μορίων καθορίζονται από τις καμπύλες θερμικής αποδιάταξης με μια συμβατική ανάλυση van't Hoff^[349]. Η αποδιάταξη της αποΑ-I περιλαμβάνει τη μετάβαση από τη διατεταγμένη F κατάσταση στην αποδιατεταγμένη U. Στο σχήμα της καμπύλης θερμικής αποδιάταξης, η θερμοκρασία τήξης, T_m , καθορίζει το μέσο της μετάβασης από την πλήρως διατεταγμένη στην αποδιατεταγμένη κατάσταση και η μεταβολή στη σχετική ενθαλπία van't Hoff (ΔH_v) είναι αντιστρόφως ανάλογη του εύρους της μετάβασης του μορίου. Στην περιοχή της μετάβασης προσδιορίζεται για κάθε θερμοκρασία η φαινόμενη σταθερά ισορροπίας (K_{eq}), σύμφωνα με την εξίσωση: $K_{eq}(T) = (\theta_F - \theta_{obs}(T)) / (\theta_{obs}(T) - \theta_U)$, όπου $\theta_{obs}(T)$ είναι η παρατηρούμενη ελλειπτικότητα σε κάθε θερμοκρασία και θ_F , θ_U είναι οι τιμές αναφοράς της πλήρως διατεταγμένης και αποδιατεταγμένης κατάστασης, αντίστοιχα. Οι τιμές θ_F , θ_U λαμβάνονται από την προσαρμογή της καμπύλης αποδιάταξης σε μοντέλο Boltzmann ή από γραμμική προέκταση της προ- και μεταμεταβατικής περιοχής. Στη συνέχεια, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση $\ln(K_{eq}) = f(1/T)$, όπου T είναι η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin και προσδιορίζεται η γραμμική εξίσωση αυτής, που

αντιστοιχίζεται στην εξίσωση: $\ln(K_{eq}) = \Delta S/R - (\Delta H_v/R) \cdot 1/T$, όπου R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων (1,98 cal/mol·K) και ΔS είναι η μεταβολή της εντροπίας^[350]. Ο δείκτης συνεργιστικότητας, n, ο οποίος περιγράφει τη σιγμοειδή μορφή της καμπύλης της θερμικής αποδιάταξης, υπολογίζεται με βάση την εξίσωση Hill^[351]: $n = (\log 81) / \log(T_{0,9}/T_{0,1})$, όπου $T_{0,1}$ και $T_{0,9}$ είναι οι θερμοκρασίες στις οποίες η αποδιάταξη της πρωτεΐνης έχει ολοκληρωθεί σε ποσοστό 10 και 90%, αντίστοιχα.

Στα πειράματα που χρησιμοποιούνται λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, τα οποία περιέχουν αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των σωματιδίων έχει συγκέντρωση 0,1 mg/mL. Όλες οι παράμετροι μέτρησης είναι όμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για τις ελεύθερες λιπιδίων αποΑ-I, με μόνη διαφοροποίηση το θερμοκρασιακό εύρος αποδιάταξης, το οποίο μεταβάλλεται από τους 20 στους 100 °C.

3.18.4 Παρακολούθηση της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-I με Φασματοσκοπία Φθορισμού

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα: DPBS 1x, pH 7,4.
- Διάλυμα 8 M GndHCl σε DPBS 1x.
- Κυψελίδα χαλαζία φθορισμού, χωρητικότητας 4 mL (Hellma Analytics).
- Φασματοφθορισμόμετρο (PTI QuantaMaster 3500, Photon Technology International, New Jersey).

Αρχή της Μεθόδου

Η φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται ευρύτατα σε μελέτες αποδιάταξης μακρομορίων, λόγω της εξαιρετικής ευαισθησίας του σήματος φθορισμού σε αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος του φθοροφόρου. Μια από τις βασικότερες εφαρμογές της τεχνικής αυτής είναι η απόκτηση θερμοδυναμικών και κινητικών πληροφοριών σχετικών με τις μεταπτώσεις των μακρομορίων. Σε μελέτες πρωτεϊνών, οι φθοροφόρες ομάδες μπορεί να είναι ενδογενείς (θρυπτοφάνη, τυροσίνη) ή εξωγενείς (φλουορεσκεΐνη, πυρένιο). Τα κατάλοιπα θρυπτοφάνης είναι ιδιαίτερα αξιόλογοι ιχνηθέτες, καθώς ο ινδολικός δακτύλιος είναι πολύ ευαίσθητος σε αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον του^[352].

Κατά τη χημική αποδιάταξη, η πρωτεΐνη χάνει τα στοιχεία της δευτεροταγούς και τριτοταγούς οργάνωσής της, λόγω της προσθήκης αυξανόμενων συγκεντρώσεων αποδιατακτικών παραγόντων. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι αποδιατακτικοί παράγοντες είναι η υδροχλωρική γουανιδίνη και η ουρία. Η χημική αποδιάταξη της αποΑ-I μελετάται φθορισμομετρικά, καταγράφοντας τον εγγενή φθορισμό των καταλοίπων θρυπτοφάνης (Trp), που βρίσκονται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (θέσεις 8, 50, 72 και 108 στην πολυπεπτιδική αλυσίδα). Η παρατηρούμενη, κατά την αποδιάταξη της αποΑ-I, μετατόπιση του μήκους κύματος προς το κόκκινο (red shift) (ή η μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού) αντιστοιχεί στην απόσβεση του φθορισμού που εκπέμπουν τα κατάλοιπα θρυπτοφάνης, καθώς αποκαλύπτονται από το υδρόφοβο εσωτερικό της πρωτεΐνης στο υδρόφιλο περιβάλλον του διαλύτη^[78,160,350].

Πειραματική διαδικασία

Στην κυψελίδα χαλαζία εισάγονται 1,5 mL πρόσφατα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης, συγκέντρωσης 0,1 mg/mL και ακολουθεί τιτλοδότηση με προσθήκη σταδιακά αυξανόμενου όγκου διαλύματος GndHCl 8 M (μέχρι τελικής συγκέντρωσης GndHCl ~3,5 M). Μετά από κάθε προσθήκη, το διάλυμα ομογενοποιείται με ήπια ανάδευση και επωάζεται για 2 min στο σκοτάδι, ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία αναδιπλωμένης-αποδιπλωμένης πρωτεΐνης. Ακολούθως, λαμβάνεται το φάσμα φθορισμού στα 310-420 nm, έπειτα από διέγερση στα 295 nm, ώστε να αποφευχθεί ο φθορισμός των καταλοίπων τυροσίνης.

Από τα φάσματα που λαμβάνονται υπολογίζεται το μέγιστο μήκος κύματος φθορισμού για κάθε συγκέντρωση GndHCl και κατασκευάζεται η γραφική παράσταση συναρτήσεως της συγκέντρωσης GndHCl. Η καμπύλη που προκύπτει προσαρμόζεται σε απλό μοντέλο Boltzman, χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs μεταξύ της φυσικά διατεταγμένης και αποδιατεταγμένης κατάστασης της πρωτεΐνης (διαμορφωτική σταθερότητα), ΔG_D° , η συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης στο μέσο της μετάβασης από την πλήρως διατεταγμένη στην αποδιατεταγμένη κατάσταση, $D_{1/2}$ και η τιμή m που αντικατοπτρίζει τη συνεργιστικότητα της αποδιάταξης στη μεταβατική περιοχή υπολογίζονται, χρησιμοποιώντας μία μέθοδο γραμμικής προεκβολής (linear extrapolation), υποθέτοντας ότι ακολουθείται το μοντέλο

αποδιάταξης δύο φάσεων^[349]. Η φαινόμενη σταθερά ισορροπίας, K_{eq} , υπολογίζεται με βάση το μέγιστο μήκος κύματος φθορισμού για κάθε συγκέντρωση GndHCl. Στη συνέχεια, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs, $\Delta G_D = -R \cdot T \cdot \ln(K_{eq})$, όπου T είναι η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin και R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων (1,98 cal/mol·K), συναρτήσει της συγκέντρωσης GndHCl, [D]^[160,350]. Από το διάγραμμα προσδιορίζονται οι τιμές των ΔG_D° , $D_{1/2}$ και m με βάση την εξίσωση: $\Delta G_D = \Delta G_D^\circ - m[D]$.

3.18.5 Προσδιορισμός της υδροφοβικότητας της αποΑ-I με χρήση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- 1-ανιλινο-ναφθαλενο-8-σουλφονικό οξύ, (1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid, ANS) (Sigma-Aldrich).
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 50 mM ANS σε DMSO.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: DPBS 1x, pH 7,4.
- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-One).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite[®] M200).

Αρχή της Μεθόδου

Η ικανότητα του ιχνηθέτη ANS να φθορίζει ισχυρά όταν προσδένεται σε υδρόφοβες επιφάνειες επιτρέπει τον προσδιορισμό των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης, που είναι φυσιολογικά εκτεθειμένες στο διαλύτη, παρουσία του ιχνηθέτη. Η ένταση φθορισμού του ANS σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών είναι μικρή και εμφανίζει μέγιστο εκπομπής στα 517 nm. Αντιθέτως, όταν ο ιχνηθέτης προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης, η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού του παρουσιάζεται ενισχυμένη και μετατοπισμένη προς το μπλε μήκος κύματος^[353,354].

Πειραματική διαδικασία

Σε φρεάτια πλακιδίου 96 φρεατίων εισάγονται 160 μ L διαλύματος αποΑ-I άγριου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της, συγκέντρωσης 0,1 mg/mL, σε DPBS 1x, pH 7,4 και προστίθεται 1 μ L διαλύματος ANS (η τελική συγκέντρωση ANS είναι \sim 310 μ M). Ακολούθως, πραγματοποιείται διέγερση των δειγμάτων στα

395 nm και λαμβάνεται το φάσμα φθορισμού στα 425-600 nm. Επιπλέον, καταγράφεται το σήμα φθορισμού του ANS απουσία πρωτεΐνης, ώστε να επιτραπεί ο υπολογισμός της ενίσχυσης του σήματος φθορισμού του ANS παρουσία της πρωτεΐνης. Για κάθε δείγμα προσδιορίζεται η επιφάνεια που καλύπτει κάθε φάσμα στην περιοχή 425-600 nm. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο λόγος της επιφάνειας του φάσματος του ιχνηθέτη παρουσία πρωτεΐνης προς την επιφάνεια του φάσματος του ιχνηθέτη απουσία πρωτεΐνης. Ο λόγος αυτός χρησιμοποιείται ως δείκτης του ποσοστού έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στο διαλύτη.

3.19 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τις πρωτεΐνες αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P]

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Υπολογιστικό πρόγραμμα AMBER 14.

Αρχή της Μεθόδου

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αποτελούν χρήσιμο συμπληρωματικό εργαλείο των πειραματικών μελετών, καθώς παρέχουν πληροφορίες για την κίνηση των μορίων στο χώρο σε ατομικό επίπεδο. Επιτρέπουν έτσι τη μελέτη περίπλοκων και δυναμικών διαδικασιών που συμβαίνουν στα βιολογικά συστήματα. Στην παρούσα εργασία, διεξήχθησαν δύο σειρές προσομοιώσεων για τις υπό εξέταση πρωτεΐνες, με βάση τις δύο κρυσταλλικές δομές που είναι διαθέσιμες για την αποΑ-I στη Βάση Δεδομένων Πρωτεϊνών (Protein Data Bank, PDB). Σκοπός ήταν να διερευνηθεί εάν οι φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] προκαλούν αλλαγές στη διαμορφωτική σταθερότητα της αποΑ-I.

Πειραματική διαδικασία

Τα μοριακά μοντέλα της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I παρασκευάστηκαν με βάση τις δύο κρυσταλλικές δομές ακτίνων-Χ, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-I στο αμινο-τελικό άκρο, αποΑ-I[Δ(1-43)] (PDB: 1AV1)^[79] και της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-I στο καρβοξυ-τελικό άκρο, αποΑ-I[Δ(185-243)] (PDB: 3R2P)^[80], αντίστοιχα. Οι τρεις υπό εξέταση μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I (L144R, A164S και L178P) παρασκευάστηκαν με αλλαγή του αντίστοιχου αμινοξικού καταλοίπου σε καθένα από τα δύο αρχεία

PDB, παράγοντας έτσι οχτώ συστήματα, που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τον ίδιο τρόπο.

Αρχικά, έγινε η προσθήκη των ατόμων υδρογόνου που λείπουν στις κρυσταλλογραφικές δομές με το πρόγραμμα XLEaP του AMBER 14 και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι παράμετροι του πεδίου δυνάμεων (force field) AMBER 14SB^[355,356]. Οι πρωτεΐνες επιδιαλυώθηκαν σε παραμορφωμένα οκτάεδρα γεμάτα με μόρια νερού TIP3P (explicit solvent), τα οποία εκτείνονταν τουλάχιστον 10 Å από τα άκρα των μορίων προς κάθε κατεύθυνση, ώστε το νερό να εμβυθίζει σημαντικά τις πρωτεΐνες, όταν είναι πλήρως εκτεταμένες, αλλά να μην αλληλεπιδρά με τις απεικονίσεις τους στα διπλανά παραμορφωμένα οκτάεδρα (Περιοδικές Οριακές Συνθήκες, Periodic Boundary Conditions) και προστέθηκαν ιόντα Na⁺, ώστε να εξουδετερωθεί το συνολικό φορτίο των συστημάτων. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PMEMD του AMBER 14 με χρονικό βήμα 2 fs και χρήση του αλγορίθμου SHAKE για τον περιορισμό όλων των δεσμών, συμπεριλαμβανομένων των ατόμων υδρογόνου. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Particle Mesh Ewald και το όριο για τον υπολογισμό των δυνάμεων van der Waals ορίστηκε στα 10 Å. Η θερμοκρασία ελέγχθηκε με θερμοστάτη Langevin και η πίεση ρυθμίστηκε με χρήση του αλγορίθμου αδύναμης σύζευξης Berendsen.

Μετά από ελαχιστοποίηση της ενέργειας, η οποία αποτελεί εναρμόνιση της αρχικής δομής με το δυναμικό πεδίο που χρησιμοποιείται, η θερμοκρασία κάθε συστήματος αυξήθηκε από τους 0 K στους 300 K ως γραμμική συνάρτηση του χρόνου κατά την προσομοίωση, η οποία διήρκησε 100 ps, υπό σταθερό όγκο (σύνολο NVT). Ακολούθως, τα συστήματα εξισορροπήθηκαν υπό σταθερή πίεση 1 bar και θερμοκρασία 300 K, σε ισοβαρικό-ισοθερμικό σύνολο (NPT). Οι πραγματικές προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο NPT, υπό τις ίδιες συνθήκες, για 200 ns, για κάθε σύστημα. Οι συντεταγμένες της τροχιάς των μορίων συλλέχθηκαν κάθε 10 ps, για περαιτέρω επεξεργασία, η οποία διεξήχθη, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CPPTRAJ του AmberTools v14^[357].

Ως μέτρο της πρωτεϊνικής σταθερότητας και ελαστικότητας χρησιμοποιήθηκε η ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (root-mean-square deviation, RMSD) και η ρίζα της μέσης τετραγωνικής διακύμανσης των ατομικών θέσεων (root-mean-square fluctuation, RMSF). Η RMSD αποτελεί αριθμητικό δείκτη της απόκλισης των διαμορφώσεων ενός μορίου σε σχέση με ένα μόριο

αναφοράς και υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση: $RMSD = \sqrt{\sum (x_i - x_{ref})^2 / N}$, όπου N: ο αριθμός των ατόμων, x_i : οι συντεταγμένες των ατόμων του κάθε μορίου και x_{ref} : οι συντεταγμένες των ατόμων του μορίου αναφοράς. Η RMSF αποτελεί τη διακύμανση της RMSD γύρω από μια μέση δομή και χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της κινητικότητας των ατόμων στο μόριο.

3.20 Καλλιέργειες κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τρεις κυτταρικές σειρές: η κυτταρική σειρά μακροφάγων μυός J774, η προερχόμενη από εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού ανθρώπου σειρά HEK293 (human embryonic kidney 293 cells) και η υβριδική σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, η οποία έχει προκύψει από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) και επιθηλιακών κυττάρων καρκινώματος πνεύμονα ανθρώπου (A549). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε πρωτογενής καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων στεφανιαίας αρτηρίας (human coronary artery endothelial cells, HCAEC).

3.20.1 Κυτταρικές σειρές J774 και HEK293

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Κύτταρα J774 και HEK293 (American Type Culture Collection).
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 4,5 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Διάλυμα 10.000 U/ml πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομυκίνης (Gibco).
- Ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) (Biosera).
- Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων (DMEM Complete): DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS και 1% v/v πεν.-στρεπ. (100 U/mL πενικιλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης).
- Διάλυμα 0,05% w/v θρυψίνης/ 0,02% w/v Na₄EDTA σε PBS, χωρίς Ca⁺² και Mg⁺² (Gibco).
- DMSO, ειδικό για κυτταροκαλλιέργειες (Sigma-Aldrich).
- Αποστειρωμένες φλάσκες καλλιέργειας, επιφάνειας 75 cm² (Greiner Bio-One).

- Αποστειρωμένα φιαλίδια φύλαξης κυττάρων σε υγρό άζωτο (Greiner Bio-one).
- Αποστειρωμένες ξύστρες αποκόλλησης κυττάρων (Greiner Bio-one).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Fisher Scientific).
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Primovert Inverted Microscope, Zeiss).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (Heraeus Labofuge 400R).

3.20.1.1 Έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων J774 και HEK293

Φιαλίδιο με κατεψυγμένα κύτταρα σε διάλυμα που περιέχει 90% v/v πλήρες θρεπτικό μέσο και 10% v/v DMSO ανασύρεται από το υγρό άζωτο (-196 °C), όπου φυλάσσεται και αποψύχεται αμέσως σε υδατόλουτρο στους 37 °C, ώστε η απόψυξη των κρυστάλλων να τραυματίσει όσο το δυνατόν λιγότερο τα κύτταρα. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου μεταφέρεται σε φλάσκα καλλιέργειας που περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο έχει εξισορροπηθεί στους 37 °C και η φλάσκα τοποθετείται σε επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C. Μετά από 18-24 h, ελέγχεται σε οπτικό μικροσκόπιο η βιωσιμότητα των κυττάρων και ο βαθμός προσκόλλησης αυτών στον πυθμένα της φλάσκας και ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο, προκειμένου να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και το DMSO.

3.20.1.2 Διατήρηση-ανάπτυξη καλλιιεργειών κυττάρων J774 και HEK293

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φλάσκες καλλιέργειας 75 cm², σε επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C και η ανάπτυξή τους ελέγχεται σε οπτικό μικροσκόπιο. Ανά δύο ή τρεις ημέρες, ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξής τους, απορρίπτεται το μέσο και προστίθεται φρέσκο, πλήρες θρεπτικό μέσο. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν μέχρι το 90% της κατάστασης συμβολής, γίνεται ανακαλλιέργεια αυτών. Τα κύτταρα J774 ανακαλλιεργούνται με τη βοήθεια ξύστρας κυττάρων, ενώ τα HEK293 με θρυψινοποίηση.

Αναλυτικότερα, τα κύτταρα J774 αποκολλώνται από τον πυθμένα της φλάσκας με ξύστρα κυττάρων, παραλαμβάνεται το εναιώρημά τους με σιφώνιο και μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon, όγκου 15 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300 x g, για 10 min και απόχυση του υπερκείμενου υγρού των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε καθορισμένο όγκο φρέσκου πλήρους θρεπτικού μέσου και μοιράζονται σε νέες φλάσκες καλλιέργειας. Συνήθως, σε κάθε νέα φλάσκα καλλιέργειας μοιράζεται το 1/6 ή το 1/8 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε τρεις μέρες, μέχρι και τρεις μήνες.

Όσον αφορά τα κύτταρα HEK293, αφαιρείται το παλιό θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται με 2 mL διαλύματος 0,05% w/v θρυψίνης⁶/ 0,02% w/v Na₄EDTA ανά φλάσκα καλλιέργειας 75 cm², για 3 min, στον επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C. Στη συνέχεια, προστίθεται ίσος όγκος FBS⁷, παραλαμβάνεται το εναιώρημα των κυττάρων και ακολουθεί η προαναφερθείσα διαδικασία.

3.20.1.3 Δημιουργία αποθεματικής καλλιέργειας κατεψυγμένων κυττάρων J774 και HEK293

Κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι συμβολής αποκολλώνται από τον πυθμένα της φλάσκας με τη βοήθεια ξύστρας κυττάρων ή θρυψίνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon, όγκου 15 mL και φυγοκεντρείται στα 300 x g, για 10 min. Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου υγρού των κυττάρων και αναδιασπορά των κυττάρων σε 3 mL διαλύματος που περιέχει 90% v/v πλήρες θρεπτικό μέσο και 10 % v/v DMSO. Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται ισάξια σε αποστειρωμένα φιαλίδια φύλαξης κυττάρων. Το DMSO προστίθεται στο διάλυμα κατάψυξης των κυττάρων ως κρυσταλλοπροστατευτικός παράγοντας, ώστε να ελαττωθεί η καταστροφή των κυττάρων από τον σχηματισμό ενδοκυτταρικών κρυστάλλων που μπορούν να οδηγήσουν σε ρήξη της μεμβράνης των κυττάρων, καθώς και για ωσμωτικούς λόγους. Τα φιαλίδια με το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετούνται σε κουτί

⁶ Η θρυψίνη πέπτει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-επιφάνειας φλάσκας. Το EDTA είναι χηλικός παράγοντας των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, τα οποία χρειάζονται οι ιντεγκρίνες για να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες για κυτταρική προσκόλληση.

⁷ Το FBS, το οποίο περιέχει αναστολείς της θρυψίνης (π.χ. α1-αντιθρυψίνη) χρησιμοποιείται για την απενεργοποίηση αυτής.

πολυστερενίου και φυλάσσονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, για 48 h, ώστε να επιτευχθεί η σταδιακή κατάψυξή τους (ιδανικά η θερμοκρασία πρέπει να μειώνεται $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Κατόπιν, τα φιαλίδια τοποθετούνται σε δοχείο υγρού αζώτου, όπου και φυλάσσονται. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα διατηρούνται στην κατάσταση που βρίσκονταν τη στιγμή της κατάψυξης, για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.20.2 Κυτταρική σειρά EA.hy926 και πρωτογενής καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων HCAEC

Η κυτταρική σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών EA.hy926 δόθηκε γενναιόδωρα από τον Δρ. Δ. Καρδάση (Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης και Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα). Η πρωτογενής καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων HCAEC και τα απαραίτητα αντιδραστήρια-υλικά για τη διατήρησή της δόθηκαν γενναιόδωρα από τη Δρ. Δ. Σανούδου (Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών και Δ' Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα). Τα κύτταρα EA.hy926 και HCAEC σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σε αριθμό ανακαλλιεργιών (passages) 6 έως 12.

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Κύτταρα EA.hy926.
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων EA.hy926: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 1 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων EA.hy926 (DMEM Complete): DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS και 2% v/v πεν.-στρεπ. (200 U/mL πενικιλίνης και 200 μg/mL στρεπτομυκίνης).
- Διάλυμα 0,25% w/v θρυψίνης/ 0,04% w/v Na₄EDTA σε PBS χωρίς Ca⁺² και Mg⁺², για τα κύτταρα EA.hy926 (Gibco).
- Πρωτογενής καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων HCAEC (Cell Applications, Inc).
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων HCAEC: Basal Human MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, Inc).
- Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων HCAEC (Complete Human MesoEndo Cell Growth Medium): Basal Human MesoEndo Cell Growth

Medium, εμπλουτισμένο με ενδοθηλιακούς παράγοντες ανάπτυξης (Growth Supplements, Cell Applications, Inc).

- Διάλυμα θρυψίνης/ EDTA για τα κύτταρα HCAEC (Trypsin/ EDTA) (Cell Applications, Inc).
- Διάλυμα απενεργοποίησης της θρυψίνης για τα κύτταρα HCAEC (Trypsin Neutralizing Solution) (Cell Applications, Inc).
- Διάλυμα έκπλυσης κυττάρων HCAEC: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Cell Applications, Inc).
- Τα επιπλέον υλικά που απαιτούνται για τον χειρισμό των κυττάρων EA.hy926 και HCAEC είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην παράγραφο 3.20.1.

3.20.2.1 Έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων EA.hy926 και HCAEC

Η διαδικασία έναρξης της καλλιέργειας των κυττάρων EA.hy926 είναι όμοια με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.20.1.1. Τα κύτταρα HCAEC δόθηκαν σε φλάσκα καλλιέργειας 75 cm².

3.20.2.2 Διατήρηση-ανάπτυξη καλλιιεργειών κυττάρων EA.hy926 και HCAEC

Για τα κύτταρα EA.hy926 ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αυτήν που περιγράφεται στην παράγραφο 3.20.1.2, με τη διαφορά ότι η θρυψινοποίηση των κυττάρων γίνεται με χρήση διαλύματος 0,25% w/v θρυψίνης/ 0,04% w/v Na₄EDTA και η απενεργοποίηση της θρυψίνης γίνεται με την προσθήκη τριπλάσιου όγκου πλήρους θρεπτικού μέσου. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων λαμβάνει χώρα κάθε τρεις μέρες.

Τα κύτταρα HCAEC ανακαλλιεργούνται όταν αναπτυχθούν μέχρι το 80% της κατάστασης συμβολής με θρυψινοποίηση. Συγκεκριμένα, αφαιρείται το παλιό θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα εκπλένονται με 2-3 mL διαλύματος HBSS. Ακολουθεί απόχυση του διαλύματος έκπλυσης των κυττάρων, προσθήκη 5 mL διαλύματος θρυψίνης/ EDTA και ήπια ανακίνηση της φλάσκας, ώστε το διάλυμα να καλύψει πλήρως τον πυθμένα της. Μετά από 1 min αφαιρούνται 4,5 mL του διαλύματος θρυψίνης/ EDTA και τα κύτταρα επωάζονται για 3 min, με το εναπομένον διάλυμα. Κατόπιν, προστίθενται 5 mL διαλύματος απενεργοποίησης της θρυψίνης, η φλάσκα ανακινείται έντονα και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon, όγκου 50 mL. Στη συνέχεια, η φλάσκα εκπλένεται με

επιπλέον 5 mL διαλύματος απενεργοποίησης της θρυψίνης και μεταφέρονται και αυτά στον ίδιο σωλήνα τύπου falcon, όγκου 50 mL. Το εναιώρημα των κύτταρων φυγοκεντρείται στα 220 x g, για 5 min, αποχύνεται το υπερκείμενο των κυττάρων και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 5 mL φρέσκου πλήρους θρεπτικού μέσου. Το 1/4 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού μοιράζεται σε νέα φλάσκα καλλιέργειας 75 cm². Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε έξι μέρες.

3.20.2.3 Δημιουργία αποθεματικής καλλιέργειας κατεψυγμένων κυττάρων EA.hy926

Η διαδικασία δημιουργίας αποθεματικής καλλιέργειας των κυττάρων EA.hy926 είναι όμοια με αυτήν που περιγράφεται στην παράγραφο 3.20.1.3.

3.21 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης από μακροφάγα J774 μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Λυοφιλοποιημένες πρωτεΐνες: αποA-I άγριου τύπου, αποA-I[V19L], αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] ή απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (βλ. παρ. 3.1).
- Διαλύματα πρωτεϊνών σε DPBS 1x, pH 7,4, συγκέντρωσης ~2 mg/ml.
- Καλλιέργεια κυττάρων J774 στο 90% της κατάστασης συμβολής.
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 4,5 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Διάλυμα 10.000 U/ml πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομυκίνης (Gibco).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS) (Biosera).
- Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) ελεύθερη λιπαρών οξέων, κατάλληλη για καλλιέργεια κυττάρων (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 10% BSA w/v σε DMEM/ 1% πεν.-στρεπ.
- [4-¹⁴C]χοληστερόλη (0,1 mCi/mL, ειδική δραστηριότητα 55 mCi/mmol σε αιθανόλη) (ARC).
- Αιθανόλη 100% (Merck).
- Διάλυμα επισήμανσης: 0,5 μL διαλύματος [4-¹⁴C]χοληστερόλης/ φρεάτιο εξατμίζεται υπό αέριο N₂, αναδιαλύεται σε 0,5 μL/ φρεάτιο αιθανόλης, προστίθεται 1 μL διαλύματος 10% w/v BSA σε DMEM/ φρεάτιο και

ακολουθεί καλή ανάδευση. Τελικά, προστίθενται 0,2 mL διαλύματος 2% w/v BSA σε DMEM, 1% v/v πεν.-στρεπ./ φρεάτιο.

- cpt-cAMP (8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3':5'-cyclic monophosphate sodium salt) (Sigma-Aldrich).
- DPBS 10x (Lonza).
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich).
- Υγρό σπινθηρισμού (βλ. παρ. 3.16).
- Πλακίδιο 48 φρεατίων (48-well plate) (Greiner Bio-One).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου erpendorf, 1,5 mL (Greiner Bio-One).
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Primovert Inverted Microscope, Zeiss).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Fisher Scientific).
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).
- Οβίδα N₂.
- Αναλυτικός ζυγός (Sartorius TE64).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).
- Πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας, όγκου 20 mL (Bioline).
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β⁻ ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

Αρχή της Μεθόδου

Η εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 πραγματοποιείται με την αλληλεπίδραση του μεταφορέα, κυρίως με την ελεύθερη λιπιδίων αποA-I, η οποία δεσμεύει βαθμιαία λιπίδια. Για τον υπολογισμό της ABCA1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, μακροφάγα κύτταρα μυός J774 επωάζονται παρουσία ή απουσία ενός αναλόγου του cAMP (cpt-cAMP), το οποίο έχει δειχθεί ότι αυξάνει την εκροή χοληστερόλης προς την αποA-I, μέσω του ABCA1, πιθανότατα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (protein kinase A, PKA), αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση του ABCA1^[358].

Πειραματική διαδικασία

Μακροφάγα μύος J774 επιστρώνονται σε πλακίδια 48 φρεατίων σε πυκνότητα 10^5 κύτταρα/ φρεάτιο σε 0,2 mL θρεπτικού μέσου (DMEM, 10% v/v FBS, 1% v/v πεν.-στρεπ.) και επωάζονται για 20-24 h, στους 37 °C. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα επισημαίνονται με 0,05 μCi / φρεάτιο [^{14}C]-χοληστερόλης σε 0,2 mL θρεπτικού μέσου (DMEM, 0,2% v/v BSA, 1% v/v πεν.-στρεπ.) και επωάζονται στους 37 °C, για 24 h. Μετά το πέρας των 24 h, τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C, για άλλες 24 h, με 0,2 mL θρεπτικού μέσου/ φρεάτιο (DMEM, 0,2% v/v BSA, 1% v/v πεν.-στρεπ.) παρουσία ή απουσία του αναλόγου του cAMP (cpt-cAMP) σε συγκέντρωση 0,3 mM. Μετά το τέλος της επώασης με το cpt-cAMP, τα κύτταρα επωάζονται με 0,2 mL θρεπτικού μέσου/ φρεάτιο (DMEM, 0,2% v/v BSA, 1% v/v πεν.-στρεπ.) παρουσία ή απουσία 1 μM άγριου τύπου ή μεταλλαγμένων αποΑ-I (αποδέκτης της χοληστερόλης) ή 2% v/v HDL για 4 h, στους 37 °C. Κατόπιν, συλλέγεται το μέσο των κυττάρων από κάθε φρεάτιο, φυγοκεντρείται στα 8.000 rpm, για 5 min, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα που έχουν συνακολουθήσει και τα κύτταρα στα πλακίδια καλλιέργειας λύονται υπό ανάδευση, με 0,2 mL διαλύματος λύσης (DPBS 1x, 1% Triton X-100)/ φρεάτιο, για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, λαμβάνονται 100 μL από το μέσο των κυττάρων (από κάθε φρεάτιο) και 200 μL από το λύμα των κυττάρων (από κάθε φρεάτιο), προστίθενται ξεχωριστά σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας, που περιέχουν 5 mL υγρό σπινθηρισμού και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Το ποσοστό της εξερχόμενης από τα κύτταρα [^{14}C]-χοληστερόλης 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) cpt-cAMP-(ABCA1-) εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία δεν επωάστηκαν με το cpt-cAMP αφαιρούνται από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επωάστηκαν με cpt-cAMP.

3.22 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης και 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293 μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 ή του υποδοχέα της HDL SR-BI

3.22.1 Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικού

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Καλλιέργεια κυττάρων HEK293 στο 90% της κατάστασης συμβολής.
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 4,5 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS) (Biosera).
- Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen).
- Opti-MEM I (Invitrogen).
- Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης: pcDNA3.1(+), pcDNA3.1-SR-BI^[359] και pcDNA3.1-ABCG1^[158].
- Πλακίδια 24 φρεατίων επικαλυμμένα με πολυ-D-λυσίνη, (poly-D-lysine coated, 24 well plate) (Greiner Bio-one).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Fisher Scientific).
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Primovert Inverted Microscope, Zeiss).
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).

Αρχή της Μεθόδου

Επιμόλυνση καλείται η διαδικασία εισαγωγής νουκλεϊνικών οξέων σε ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω μη ιϊκής μεθόδου. Υπάρχουν πολλοί τρόποι εισαγωγής DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: κατιονικός (πολυμερών), λιποσωμάτων και νανοσωμάτων. Στην παρούσα μελέτη, ακολουθήθηκε η εισαγωγή DNA μέσω λιποσωμάτων, με τη χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000. Η Lipofectamine 2000 σχηματίζει κυστίδια, τα οποία περιβάλλουν το DNA. Η μεμβράνη των κυστιδίων αυτών ομοιάζει με την κυτταρική μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων. Όταν εισάγονται λιποσώματα σε θρεπτικό μέσο κυττάρων και έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα, τότε οι δυο μεμβράνες συντήκονται και το περιεχόμενο 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 HEK293 επιστρώνονται σε πλακίδια 24 φρεατίων επιστρωμένα με poly-D-λουσίνη σε πυκνότητα 10^5 κύτταρα/ φρεάτιο σε 0,5 mL θρεπτικού μέσου (DMEM, 10% v/v FBS) απουσία αντιβιοτικών⁸ και επωάζονται στους 37 °C, μέχρι συμβολής ~90%. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επιμολύνονται με τον φορέα έκφρασης pcDNA3.1-SR-BI ή pcDNA3.1-ABCG1 που φέρει το cDNA της αλληλουχίας του ανθρώπινου υποδοχέα της HDL SR-BI ή του ανθρώπινου μεταφορέα λιπιδίων ABCG1, αντίστοιχα, ή με τον φορέα έκφρασης απουσία του ενθέματος (mock). Για να γίνει η επιμόλυνση, αρχικά, αραιώνονται για κάθε φρεάτιο 0,5 µg DNA σε 25 µL opti-MEM I και αναμειγνύονται ήπια. Επίσης, αραιώνεται για κάθε φρεάτιο 1 µL Lipofectamine 2000 σε 25 µL opti-MEM I, αναμειγνύονται ήπια και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 min. Μετά τα 5 min επώασης, προστίθεται το αραιωμένο DNA στην αραιωμένη Lipofectamine 2000, αναμειγνύονται ήπια και επωάζονται για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, 50 µL μείγματος μεταφέρονται σε κάθε φρεάτιο που περιέχει κύτταρα σε 0,45 mL θρεπτικού μέσου (DMEM, 10% v/v FBS θερμικά απενεργοποιημένο⁹) και ακολουθεί επώαση για 4 h, στους 37 °C. Κατόπιν της επώασης, τα κύτταρα επεξεργάζονται, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.22.2.

3.22.2 Δοκιμασία εκροής χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 που έχουν επιμολυνθεί με τον φορέα έκφρασης pcDNA 3.1-SR-BI ή pcDNA 3.1-ABCG1

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- rHDL σωματίδια που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της (βλ. παρ. 3.15.1).
- Κύτταρα HEK293 επιμολυσμένα με τους φορείς επιλογής (βλ. παρ. 3.22.1).
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 4,5 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS) (Biosera).

⁸ Κατά την επιμόλυνση με λιποσώματα, τα κύτταρα γίνονται περισσότερο διαπερατά στο αντιβιοτικό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα και μείωση της αποτελεσματικότητας της επιμόλυνσης.

⁹ Θερμική απενεργοποίηση FBS: 55 °C για 45 min.

- Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) ελεύθερη λιπαρών οξέων, κατάλληλη για καλλιέργεια κυττάρων (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα 10% BSA w/v σε DMEM.
- [4-¹⁴C]χοληστερόλη (0,1 mCi/mL, ειδική δραστικότητα 55 mCi/mmol σε αιθανόλη) (ARC).
- Αιθανόλη 100% (Merck).
- Διάλυμα επισήμανσης: 1,1 μL διαλύματος [4-¹⁴C]χοληστερόλης/ φρεάτιο εξατμίζεται υπό αέριο N₂, αναδιαλύεται σε 0,5 μL/ φρεάτιο αιθανόλης και ακολουθεί καλή ανάδευση. Τελικά, προστίθενται 0,5 mL διαλύματος 10% v/v FBS (θερμικά απενεργοποιημένο) σε DMEM/ φρεάτιο.
- NaOH (Applichem).
- Διάλυμα 1M NaOH σε H₂O.
- Υγρό σπινθηρισμού (βλ. παρ. 3.16).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου erpendorf, 1,5 mL (Greiner Bio-One).
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Primovert Inverted Microscope, Zeiss).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Fisher Scientific).
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).
- Οβίδα N₂.
- Αναλυτικός ζυγός (Sartorius TE 64).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).
- Πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας, όγκου 20 mL (Bioline).
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β⁻ ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer).

Αρχή της Μεθόδου

Τα rHDL σωματίδια (βλ. παρ. 3.15.1) χρησιμοποιήθηκαν ως αποδέκτες της χοληστερόλης, για τη μελέτη της εκροής χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1 και του υποδοχέα της HDL SR-BI. Η εκροή χοληστερόλης μέσω ABCG1 πραγματοποιείται με τη διευκόλυνση από τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1 της πρόσληψης χοληστερόλης από HDL σωματίδια, χωρίς ακόμα να είναι γνωστός

ο ακριβής μηχανισμός^[159,360]. Η εκροή χοληστερόλης μέσω του SR-BI απαιτεί τον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ του SR-BI και των rHDL σωματιδίων. Η δέσμευση της HDL στον SR-BI περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, με δομικό μοτίβο αναγνώρισης τις αμφιπαθητικές α-έλικες της αποΑ-I^[166,361].

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, γίνεται η επιμόλυνση των κυττάρων HEK293 με τον φορέα έκφρασης pcDNA3.1-SR-BI ή pcDNA3.1-ABCG1 που φέρει το cDNA της αλληλουχίας του ανθρώπινου υποδοχέα της HDL SR-BI ή του ανθρώπινου μεταφορέα λιπιδίων ABCG1, αντίστοιχα ή με τον φορέα έκφρασης απουσία του ενθέματος (mock), με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.22.1. Μετά από 4 h επώασης, απομακρύνεται το μέσο που περιέχει τα σύμπλοκα DNA/Lipofectamine 2000 και αντικαθίσταται με 0,5 mL θρεπτικού μέσου (DMEM, 10% v/v FBS θερμικά ανενεργό) που περιέχει 0,11 μCi [¹⁴C]-χοληστερόλη/ φρεάτιο. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 20 h, στους 37 °C. Μετά το πέρας των 24 h, αφαιρείται το μέσο και τα κύτταρα επωάζονται με 0,5 mL θρεπτικού μέσου (DMEM, 0,2% v/v BSA) παρουσία ή απουσία 1 μM rHDL σωματιδίων (ως προς την αποΑ-I) που περιέχουν είτε την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της για 4 h, στους 37 °C. Κατόπιν, συλλέγεται το μέσο των κυττάρων από κάθε φρεάτιο, φυγοκεντρείται στα 8.000 rpm, για 5 min, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα που έχουν συνακολουθήσει και τα κύτταρα στα πλακίδια καλλιέργειας λύνονται υπό ανάδευση με 1 mL διαλύματος 1 M NaOH/ φρεάτιο, για 1 h, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, λαμβάνεται όλο το μέσο των κυττάρων (από κάθε φρεάτιο) και όλο το λύμα των κυττάρων (από κάθε φρεάτιο), προστίθενται ξεχωριστά σε πλαστικά φιαλίδια μέτρησης ραδιενέργειας, που περιέχουν 5 mL υγρό σπινθηρισμού και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Το ποσοστό της εξερχόμενης από τα κύτταρα [¹⁴C]-χοληστερόλης 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) SR-BI και ABCG1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο mock αφαιρούνται από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης pcDNA 3.1-SR-BI ή pcDNA 3.1-ABCG1.

3.22.3 Δοκιμασία εκροής 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293 που έχουν επιμολυνθεί με τον φορέα έκφρασης pcDNA 3.1-ABCG1

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] (βλ. παρ. 3.15.1).
- 1,2,6-³H]-7-κετοχοληστερόλη (1 mCi/mL, ειδική δραστικότητα 40 Ci/mmol σε αιθανόλη) (ARC).
- Τα υπόλοιπα υλικά που απαιτούνται για την εκροή 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293 είναι όμοια με αυτά της παραγράφου 3.22.2.

Αρχή της Μεθόδου

Η εκροή 7-κετοχοληστερόλης μέσω ABCG1 πραγματοποιείται με τη διευκόλυνση από τον ABCG1 της πρόσληψης 7-κετοχοληστερόλης από rHDL σωματίδια, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός^[156,158].

Πειραματική διαδικασία

Ακολουθείται η ίδια ακριβώς πορεία που αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.22.2 με τη διαφορά ότι το διάλυμα επισήμανσης περιέχει 0,8 μCi 1,2,6- ³H]-7-κετοχοληστερόλη/ φρεάτιο. Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) ABCG1-εξαρτώμενης εκροής 7-κετοχοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο mock αφαιρούνται από τα ποσοστά εκροής 7-κετοχοληστερόλης κυττάρων που επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης pcDNA 3.1-ABCG1.

3.23 Επίδραση της αποΑ-I/HDL στη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων

3.23.1 Δοκιμασία προσομοίωσης επούλωσης πληγών (wound healing assay) σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 και HCAEC

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της (βλ. παρ. 3.15.1).
- Καλλιέργεια κυττάρων EA.hy926 στο 90% της κατάστασης συμβολής.

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων EA.hy926: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 1 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Διάλυμα 10.000 U/ml πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομικίνης (Gibco).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS) (Biosera).
- Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων EA.hy926 (DMEM Complete): DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS και 2% v/v πεν.-στρεπ. (200 U/mL πενικιλίνης και 200 μg/mL στρεπτομικίνης).
- Πρωτογενής καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων HCAEC (Cell Applications, Inc).
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων HCAEC: Basal Human MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, Inc).
- Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων HCAEC (Complete Human MesoEndo Cell Growth Medium): Basal Human MesoEndo Cell Growth Medium, εμπλουτισμένο με ενδοθηλιακούς παράγοντες ανάπτυξης (Growth Supplements, Cell Applications, Inc).
- Πρωτεύον μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 (R&D Systems).
- Διάλυμα μονιμοποίησης: Μεθανόλη (CH₃OH) (Sigma-Aldrich).
- DPBS 10x (Lonza).
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα διάτρησης: 0,1 % v/v Triton X-100 σε DPBS 1x.
- Αιματοξυλίνη (Sigma-Aldrich).
- Πλακίδιο 12 φρεατίων (12-well plate) (Greiner Bio-One).
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια αυτόματων πιπεττών.
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Fisher Scientific).
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Zeiss Primovert Inverted Microscope, Zeiss).
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert 25, Zeiss).

Αρχή της Μεθόδου

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η αποΑ-I/HDL επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω μοριακών οδών που ενδεχομένως προάγουν τη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου του έσω χιτώνα *in vivo*^[215,362].

Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα EA.hy926 και HCAEC επιστρώνονται σε πλακίδια 12 φρεατίων σε πυκνότητα $1,8 \times 10^5$ κύτταρα/ φρεάτιο και 10^5 κύτταρα/ φρεάτιο, αντίστοιχα, σε 0,5 mL κατάλληλου πλήρους θρεπτικού μέσου και επωάζονται στους 37 °C, μέχρι συμβολής ~90%. Κατόπιν, τα κύτταρα EA.hy926 και HCAEC συγχρονίζονται με 0,5 mL θρεπτικού μέσου (DMEM, 2% v/v πεν.-στρεπ. και Basal MesoEndo, 0,5% v/v FBS, 1% v/v πεν.-στρεπ., αντίστοιχα) για 16 h, στους 37 °C. Την επόμενη ημέρα, με τη χρήση του ακρορυγχίου πιπέττας 200 μ L, χαράσσεται μία κάθετη γραμμή (τεχνητή πληγή) στη μονοστιβάδα της κυτταροκαλλιέργειας, μήκους ίσου με τη διάμετρο του πηγαδιού και πλάτους ίσου με τη διάμετρο του ακρορυγχίου, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα εκπλένονται με DPBS 1x, εξισορροπημένο στους 37 °C, ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί. Στα κύτταρα EA.hy926 και HCAEC προστίθενται 0,5 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου (DMEM, 2% v/v πεν.-στρεπ. και Basal MesoEndo, 0,5% v/v FBS, 1% v/v πεν.-στρεπ., αντίστοιχα), παρουσία ή απουσία 100 μ g/mL rHDL σωματιδίων (ως προς την αποΑ-I) που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της. Μόλις γίνει η χορήγηση των rHDL σωματιδίων (T_{0h}), τα κύτταρα φωτογραφίζονται σε οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (αντικειμενικός φακός 10x και 5x, αντίστοιχα) σε τέσσερα οπτικά πεδία και επωάζονται στους 37 °C, για 24 h. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με 0,5 mL παγωμένου DPBS 1x και επωάζονται με 0,5 mL παγωμένου διαλύματος μονιμοποίησης για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση δύο φορές με 0,5 mL παγωμένου DPBS 1x και επώαση των μονιμοποιημένων κυττάρων με 0,5 mL παγωμένου διαλύματος διάτρησης για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με 0,5 mL παγωμένου DPBS 1x, βάζονται με 0,5 mL διαλύματος αιματοξυλίνης για 5 min, εκπλένονται με 0,5 mL H₂O και φωτογραφίζονται ξανά (T_{24h}), ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση των rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Από τις φωτογραφίες του κάθε δείγματος προσδιορίζεται η επιφάνεια του κενού σε χρόνο T_{0h} και T_{24h} για τα κύτταρα EA.hy926, ενώ για τα κύτταρα HCAEC προσδιορίζεται ο αριθμός των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει εντός του κενού σε χρόνο T_{24h} , με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Image J. Η επίδραση των rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των κυττάρων EA.hy926 εκφράζεται ως το % ποσοστό της επιφάνειας του κενού που έχουν καλύψει τα κύτταρα σε T_{24h} και υπολογίζεται ως εξής: $\% \text{ κλείσιμο του κενού } (T_{24h}) = [\text{επιφάνεια κενού } (T_{0h}) - \text{επιφάνεια κενού } (T_{24h})] / [\text{επιφάνεια κενού } (T_{0h})] \times 100$. Αντίστοιχα δε, η επίδραση των rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των κυττάρων HCAEC εκφράζεται ως το εκατοστιαίο ποσοστό του αριθμού των κυττάρων αναφοράς.

Σε επιλεγμένα πειράματα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αντισώματος έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1, παρουσία ή απουσία 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rHDL σωματιδίων (ως προς την αποΑ-I) που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι όμοια με την προαναφερθείσα.

3.23.2 Μελέτη της επίδρασης δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL στη μοριακή οδό σηματοδότησης της μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926

3.23.2.1 Επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 με δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] (βλ. παρ. 3.15.1).
- Καλλιέργεια κυττάρων EA.hy926 στο 90% της κατάστασης συμβολής.
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων EA.hy926: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 1 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Διάλυμα 10.000 U/ml πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομυκίνης (Gibco).
- Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) (Biosera).
- Πρωτεύον μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 (R&D Systems).
- Πλακίδιο 12 φρεατίων (12-well plate) (Greiner Bio-One).

- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Fisher Scientific).
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Primovert Inverted Microscope, Zeiss).

Αρχή της Μεθόδου

Η αποΑ-I/HDL επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω μοριακών οδών, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου. Ένας προτεινόμενος μοριακός μηχανισμός αναφέρει ότι η πρόσδεση της HDL στον υποδοχέα της SR-BI οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινασών Src/PI3K/Akt/Rac GTPase, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελασματοποδίων (lamellipodia) και τελικά τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων^[198,215,217].

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα EA.hy926 επωάζονται παρουσία ή απουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S], όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.1, χωρίς όμως να προκληθεί η τεχνητή πληγή. Μετά το πέρας της επώασης, συλλέγεται το θρεπτικό μέσο των κυττάρων και τα κύτταρα λύνονται, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.2.2. Το συλλεχθέν μέσο φυγοκεντρείται στα 8.000 rpm, για 10 min και μεταφέρεται σε καθαρούς σωλήνες τύπου erpendorf. Κατόπιν, προστίθενται σε κάθε δείγμα 30 μL μείγματος αναστολέων πρωτεασών και τα δείγματα φυλάσσονται στους -80 °C, για περαιτέρω πειραματική χρήση.

Σε επιλεγμένα πειράματα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 15 μg/mL αντισώματος έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1, παρουσία ή απουσία 100 μg/mL rHDL σωματιδίων (ως προς την αποΑ-I) που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S].

3.23.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, C₄H₁₁NO₃) (Applichem).
- 12 M HCl (Merck). Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH.

- NaCl (Applichem).
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) (Riedel de Haen).
- Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS) (Sigma-Aldrich).
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich).
- Δεοξυχολικό νάτριο (Sigma-Aldrich).
- Μείγμα αναστολέων πρωτεασών απαλλαγμένο από EDTA (cOmplete ULTRA Tablets EDTA-free Protease Inhibitors Cocktail, Roche Life Science).
- Μείγμα αναστολέων φωσφατασών (Phosphatase Inhibitors Tablets PhosSTOP™, Roche Life Science).
- Διάλυμα λύσης κυττάρων: 50 mM Tris-HCL, pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,25% w/v δεοξυχολικό νάτριο, 1% v/v Triton X-100, 0,1% w/v SDS, μείγμα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών 1x.
- DPBS 10x (Lonza).
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).

Αρχή της Μεθόδου

Το απορρυπαντικό που περιέχεται στο διάλυμα λύσης διαλυτοποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες, ενώ τα άλατα διαμορφώνουν τις κατάλληλες συνθήκες pH και ιονικής ισχύος, ώστε να παραμένουν διαλυτές οι κυτταρικές πρωτεΐνες. Οι αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία λύσης (4 °C) παρεμποδίζουν τη δράση ενδοκυτταρικών πρωτεασών και φωσφατασών, που απελευθερώνονται κατά τη λύση, αποτρέποντας έτσι την αποικοδόμηση και αποφωσφορυλίωση των κυτταρικών πρωτεϊνών, αντίστοιχα.

Πειραματική διαδικασία

Εφόσον έχει απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο των κυττάρων, τα κύτταρα εκπλένονται με 0,5 mL παγωμένου DPBS 1x. Κατόπιν, προστίθενται 150 μL παγωμένου διαλύματος λύσης/ φρεάτιο και τα κύτταρα επωάζονται σε πάγο, υπό έντονη ανακίνηση, για 1 h. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα αποκολλώνται από τα φρεάτια του πλακιδίου με τη βοήθεια ξύστρας κυττάρων και μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου erpendorf. Τα εναιωρήματα των κυττάρων αναδεύονται ισχυρά και παραμένουν σε πάγο, για 30 min, υπό έντονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά

διαστήματα. Στη συνέχεια, ψύχονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, για 1 h και ξεπαγώνονται απότομα στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των εναιωρημάτων στα 13.000 rpm, για 10 min, υπό ψύξη. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε καθαρούς σωλήνες τύπου erpendorf, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιέχουν με τη δοκιμασία BCA^[363] και φυλάσσονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, για περαιτέρω πειραματική χρήση.

3.23.2.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση κατά western

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Applichem).
- Γλυκίνη (Sigma-Aldrich).
- Μεθανόλη (CH_3OH) (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα μεταφοράς 1x (transfer buffer): 3,03 g Tris, 14,4 g γλυκίνη σε 800 mL H_2O και 200 mL CH_3OH .
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Biosciences Corporation).
- Χαρτί Whatman (Sigma-Aldrich).
- Tween-20 (Sigma-Aldrich).
- DPBS 10x (Lonza).
- Διάλυμα πλύσης: 0,1% v/v Tween-20 σε DPBS 1x.
- Άπαχο γάλα σε σκόνη (Regilait).
- Διάλυμα πρόσδεσης των μη ειδικών θέσεων δέσμησης των πρωτεϊνών (blocking): 5% w/v άπαχο γάλα σε διάλυμα πλύσης.
- Διάλυμα 5% w/v BSA σε διάλυμα πλύσης.
- Πρωτεύοντα αντισώματα: Τα χαρακτηριστικά των πρωτευόντων αντισωμάτων, καθώς και η αραίωση που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 3.3.
- Δευτερεύοντα αντισώματα: Αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης IgG μύος συζευγμένο με την υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (horseradish peroxidase, HRP) (Chemicon). Αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης IgG κουνελιού συζευγμένο με την HRP (Chemicon).
- Αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) (Pierce).

- Μηχάνημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (Luminescent Image Analyzer, LAS 4000, Fujifilm).
- Συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης Mini-protean II (Biorad).
- Τροφοδοτικό Consort Bioblock E341.

Πίνακας 3.3. Τα χαρακτηριστικά και η αραίωση των πρωτεϊνών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αποτύπωση western.

Αντίσωμα	Έναντι της/του ανθρώπου	Μονοκλωνικό/ Πολυκλωνικό	Προέλευση	Αραίωση	Εταιρεία
D9E	Φωσφο-Akt (pAkt)	Μονοκλωνικό	Κουνέλι	1:2.000	Cell Signaling Technology
C67E7	Akt (pan)	Μονοκλωνικό	Κουνέλι	1:2.000	Cell Signaling Technology
MAB1798	LOX-1	Μονοκλωνικό	Μύς	1:500	R&D Systems
NB400-101	SR-BI	Πολυκλωνικό	Κουνέλι	1:1.000	Novus
13E5	β-ακτίνη	Μονοκλωνικό	Κουνέλι	1:2.000	Cell Signaling Technology

Αρχή της Μεθόδου

Οι πρωτεΐνες κατόπιν του διαχωρισμού τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται σε μεμβράνη πολυμερούς (πχ. νιτροκυτταρίνης), γεγονός που τις ακινητοποιεί και τους επιτρέπει να συνδέονται με το πρωτεΐον αντίσωμα, που προστίθεται στη συνέχεια και είναι ειδικό για την υπό αναζήτηση πρωτεΐνη. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια της μεμβράνης ανιχνεύεται με την προσθήκη ενός δευτερεύοντος αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρωτεΐον αντίσωμα. Ένα ένζυμο δεσμευμένο στο δευτερεύον αντίσωμα οδηγεί με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος στον σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος ή προϊόντος που εκπέμπει χημειοφωταύγεια, ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί. Το ποσό του δευτερεύοντος αντισώματος που δεσμεύεται στην επιφάνεια είναι ανάλογο με την ποσότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, 30 μg από τα δείγματα κυτταρικών λυμάτων διαχωρίζονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10 ή 12% v/v, ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό εξέταση πρωτεΐνης, με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Μετά το πέρας της

ηλεκτροφόρησης, η πηκτική επωάζεται σε διάλυμα μεταφοράς για 10 min και τοποθετείται μαζί με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τα τρία χαρτιά Whatman, που έχουν επίσης εξισορροπηθεί σε διάλυμα μεταφοράς, στην κασέτα μεταφοράς, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται ένα sandwich μεταξύ τους. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V, για 1 h και 45 min, στους 4 °C. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται σε κατάλληλο πλαστικό δοχείο και επωάζεται με το διάλυμα blocking για 1 h, σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη εκπλένεται με το διάλυμα πλύσης τρεις φορές για 10 min, κάθε φορά. Κατόπιν, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σακουλάκι, προστίθεται το πρωτεύον αντίσωμα που είναι ειδικό για την υπό αναζήτηση πρωτεΐνη σε διάλυμα blocking ή διάλυμα 5% w/v BSA (για τις πρωτεΐνες pAkt, Akt) και επωάζεται στους 4 °C, για ~16 h, υπό ανακίνηση. Την επόμενη ημέρα, η μεμβράνη εκπλένεται τρεις φορές με διάλυμα πλύσης για 10 min, κάθε φορά, τοποθετείται σε καθαρό σακουλάκι με το δευτερεύον αντίσωμα (αντίσωμα για την IgG κουνελιού ή μύος σε αραιώση 1:2.000 σε διάλυμα blocking) και επωάζεται για 1 h, υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, εκπλένεται τρεις φορές, για 10 min κάθε φορά, με το διάλυμα πλύσης. Τελικά, η μεμβράνη επωάζεται με το μείγμα διαλυμάτων του kit της χημειοφωταύγειας (ECL), τοποθετείται στο μηχάνημα εμφάνισης χημειοφωταύγειας και συλλέγονται φωτογραφίες της μεμβράνης στον υπολογιστή. Τα ανοσοαποτυπώματα ποσοτικοποιούνται πυκνομετρικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας κάθε ζώνης των υπό εξέταση πρωτεϊνών κάθε δείγματος κανονικοποιούνται με την τιμή της οπτικής πυκνότητας της πρωτεΐνης ελέγχου β-ακτίνης (housekeeping gene) του κάθε δείγματος. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας των ζωνών των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών κάθε δείγματος κανονικοποιούνται με τις τιμές της οπτικής πυκνότητας των ζωνών των ολικών τους πρωτεϊνών κάθε δείγματος.

3.24 Προσδιορισμός των επιπέδων της μηλονικής διαλδεΐδης (malondialdehyde, MDA)

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Υπερκεείμενο μέσο κυττάρων (βλ. παρ. 3.23.2.1).
- Εμπορικά διαθέσιμο kit προσδιορισμού των επιπέδων της MDA, Cayman TBARS Assay kit (Cayman Chemical), που περιέχει:

- Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA).
- Οξικό οξύ 4x.
- 3,5 M NaOH.
- Πρότυπο διάλυμα 500 μM MDA.
- 10% w/v Τριχλωροξικό οξύ (TCA).
- Χρωμογόνο: 106 mg TBA σε 10 mL οξικό οξύ 1x και 10 mL 0,875 M NaOH.
- Πλακίδιο 96 φρεατίων (Greiner Bio-one).
- Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας 24 θέσεων (hot plate) (VWR Scientific).
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200).
- Επιτραπέζια, ψυχόμενη φυγόκεντρος (BIOFUGE fresco Heraeus).

Αρχή της Μεθόδου

Η MDA είναι ένα φυσικά απαντώμενο προϊόν υπεροξειδωσής των λιπιδίων και χρησιμοποιείται ως δείκτης του οξειδωτικού στρες σε κύτταρα και ιστούς. 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 σχηματίζει σύμπλοκα με το TBA σε υψηλή θερμοκρασία (90-100 °C), σε όξινο περιβάλλον, τα οποία είναι ανιχνεύσιμα χρωματομετρικά στα 530-540 nm ή φθορισμομετρικά (εκπομπή: 550 nm, διέγερση: 530 nm)^[364].

Πειραματική διαδικασία

Προτιμήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων της MDA φθορισμομετρικά, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της μέτρησης. Αρχικά, 400 μL από το υπερκείμενο μέσο των κυττάρων συμπυκνώνονται υπό κενό, μέχρι όγκου 100 μL. Κατόπιν, 25 μL του προτύπου διαλύματος MDA αραιώνονται με 975 μL H₂O και από το διάλυμα που προκύπτει παρασκευάζονται πρότυπα MDA για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς (τελική συγκέντρωση MDA ανά φρεάτιο: 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2,5 και 5 μM). Στη συνέχεια, 100 μL δείγματος ή προτύπων μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου erpendorf, αναμειγνύονται με 900 μL χρωμογόνου αντιδραστήριου και επωάζονται για 1 h, στους 100 °C. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 10 min, στον πάγο, ώστε να τερματιστεί η αντίδραση και φυγοκέντρωση για 10 min, στα 1.600 x g, στους 4 °C. Τελικά, 200 μL δείγματος ή προτύπων μεταφέρονται σε πλακίδιο 96 φρεατίων και η ένταση του φθορισμού,

που παράγεται, μετράται στα 550 nm, έπειτα από διέγερση στα 530 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο των κυττάρων, απουσία ορού. Η περιεχόμενη ποσότητα MDA υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

3.25 Μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε κύτταρα EA.hy926

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] (βλ. παρ. 3.15.1).
- Καλλιέργεια κυττάρων EA.hy926 στο 90% της κατάστασης συμβολής.
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων EA.hy926: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιέχει GLUTAMAX™-I and 1 g/L γλυκόζη (Gibco).
- Διάλυμα 10.000 U/ml πενικιλίνης και 10 mg/mL στρεπτομυκίνης (Gibco).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS) (Biosera).
- Διοξικός εστέρας της 2',7'-διχλωρο-διϋδρο-φλουορεσκεΐνης (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, H₂DCFDA) (Invitrogen).
- DPBS 10x (Lonza).
- Πλακίδιο 12 φρεατίων (12-well plate) (Greiner Bio-One).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUAIRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% v/v CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Fisher Scientific).
- Υδατόλουτρο 37 °C (Bioline Technologies).
- Μικροσκόπιο φθορισμού ανάστροφης φάσης (Axiovert 25, Zeiss).

Αρχή της Μεθόδου

Ο ενδοκυτταρικός σχηματισμός των ROS μετρήθηκε με τη μέθοδο των Bae et al., 1997, τροποποιημένη για μικροσκοπία φθορισμού. Τα κύτταρα επωάζονται με τον ευαίσθητο σε συνθήκες οξειδοαναγωγής H₂DCFDA. Ο H₂DCFDA προσλαμβάνεται από τα κύτταρα και υπό τη δράση των κυτταρικών εστερασών μετατρέπεται σε DCFH (βλ. παρ. 3.6), η οποία παγιδεύεται ενδοκυτταρικά. Η οξείδωση της DCFH από τις ROS έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε DCF, η οποία στη συνέχεια ανιχνεύεται με μικροσκοπία φθορισμού^[365,366].

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα EA.hy926 επωάζονται παρουσία ή απουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S], όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.1, χωρίς όμως να προκληθεί η τεχνητή πληγή. Στο τέλος της επώασης, τα κύτταρα εκπλένονται με DMEM και επωάζονται στο σκοτάδι με 0,5 mL DMEM που περιέχει 25 μ M H₂DCF-DA, για 45min, στους 37 °C. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με DPBS 1x, εξισορροπημένο στους 37 °C και ο σχηματισμός των ROS μετράται με την ανίχνευση του εκπεμπόμενου από τα κύτταρα φθορισμού της DCF με ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού (εκπομπή: 520 nm, διέγερση: 450-490 nm).

Από τις φωτογραφίες του κάθε δείγματος μετράται η ένταση φθορισμού από τουλάχιστον 40 κύτταρα ανά εικόνα, για κάθε δείγμα, με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Image J. Η σχετική ένταση του φθορισμού του κάθε δείγματος προκύπτει από τον μέσο όρο των τιμών που συλλέγονται από τουλάχιστον 20 φωτογραφίες για κάθε πείραμα. Ο φθορισμός των κυττάρων που επωάζονται με τις διάφορες μορφές της αποΑ-I εκφράζεται ως το % ποσοστό του φθορισμού των κυττάρων αναφοράς (απουσία αποΑ-I).

3.26 Πληθυσμός ασθενών μελέτης και στατιστική ανάλυση δεδομένων

Τα άτομα μελέτης, τριάντα πέντε στον αριθμό, επελέγησαν μεταξύ ασθενών που έχουν διαγνωστεί με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα (ΑΣ) ή/και παρακολουθούνται στα εξωτερικά ιατρεία της Ρευματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων στην Ελλάδα. Οι ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με ΑΣ θα πρέπει να πληρούν τα τροποποιημένα κριτήρια της Νέας Υόρκης του 1984^[367]. Η ενεργότητα της νόσου ΑΣ μετρήθηκε με τον Δείκτη Δραστηριότητας ΑΣ (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, BASDAI)^[368]. Ανεργή θεωρείται η νόσος, όταν ο BASDAI είναι μικρότερος από 4. Τα κριτήρια αποκλεισμού ασθενών ήταν η κληρονομική δυσλιπιδαιμία, οι αυτοάνοσες καταστάσεις που δε συνάδουν με την ΑΣ, η ενεργός λοίμωξη κατά τη στιγμή της αξιολόγησης, η ηπατική ή νεφρική νόσος, η κακοήθεια, η κατάχρηση αλκοόλ, η εγκυμοσύνη και η γαλουχία. Όλοι οι ασθενείς τελούσαν υπό θεραπεία έναντι του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκου-α (anti-tumor necrosis factor-α, anti-TNF-α), ενώ έξι από αυτούς τελούσαν υπό θεραπεία με τροποποιητικά της νόσου

αντιρρευματικά φάρμακα (disease-modifying antirheumatic drugs, DMARD), και ένας από αυτούς λάμβανε επίσης στεροειδή. Τα άτομα αναφοράς, τριάντα πέντε στον αριθμό, επελέγησαν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ταιριάζουν με τους ασθενείς ως προς την ηλικία και το φύλο, καθώς και να πληρούν τα παραπάνω κριτήρια αποκλεισμού. Τα άτομα μελέτης θεωρήθηκε ότι πάσχουν από καρδιαγγειακή νόσο (KAN), εάν είχαν τεκμηριωμένο ιστορικό καρδιαγγειακών συμβάντων, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infraction, MI), αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή ασταθή στηθάγχη (unstable angina, UA). Επιπρόσθετα, τα άτομα μελέτης που είχαν δείκτη μάζα σώματος (body mass index, BMI) >30, ταξινομήθηκαν ως παχύσαρκα. Η λήψη αίματος από τα άτομα μελέτης έγινε κατόπιν ολονύκτιας νηστείας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε κατόπιν ενημέρωσης και συναίνεσης των ασθενών και των ατόμων αναφοράς και έγκρισης από την επιτροπή δεοντολογίας του ιδρύματος.

Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με το λογισμικό GraphPad Prism και το IBM SPSS. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως οι μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση, εκτός εάν υποδεικνύονται διαφορετικά. Η ομάδα των ασθενών με ΑΣ και η ομάδα των ατόμων αναφοράς συγκρίθηκαν μεταξύ τους, χρησιμοποιώντας το t-τεστ (Student's t-test) για τις συνεχείς μεταβλητές και το χ^2 -τεστ (chi-square test) για τη συσχέτιση των κατηγορικών μεταβλητών. Όπου ενδείκνυται, το p προσαρμόστηκε με το γενικό γραμμικό μοντέλο μονομεταβλητής ανάλυσης, συμπεριλαμβάνοντας ως ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο, το κάπνισμα, την ΚΑΝ, την υπέρταση, την παχυσαρκία, το διαβήτη και τη χρήση στατινών. Ο έλεγχος για την κανονικότητα της κατανομής των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το τεστ D' Agostino-Pearson. Εκτός από τις τιμές που ελήφθησαν από τη δοκιμασία DCF, όλα τα υπόλοιπα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών αξιολογήθηκαν με το συντελεστή συσχέτισης Spearman για μη κανονική κατανομή δεδομένων.

Οι αριθμητικές τιμές που προέκυψαν από τη μελέτη των φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων της apoA-I παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση. Οι αριθμητικές τιμές της apoA-I άγριου τύπου συγκρίθηκαν με τις αριθμητικές τιμές κάθε μεταλλαγμένης μορφής της, 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 5.0.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηρισμός των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα (ΑΣ)

Η ΑΣ είναι χρόνια, φλεγμονώδης, ρευματική νόσος, η οποία κατά κύριο λόγο προσβάλλει τον αξονικό σκελετό (τη σπονδυλική στήλη και τις ιερολαγόνιες αρθρώσεις) και τις περιφερικές αρθρώσεις, αλλά και πλήθος εξωαρθρικών θέσεων, συμπεριλαμβανομένων των οφθαλμών και του εντέρου^[369]. Σε ασθενείς με ΑΣ έχει διαπιστωθεί 1,6-1,9 φορές υψηλότερη πρώιμη θνησιμότητα, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό^[267,268]. Μελέτες σχετικά με τις αιτίες θανάτου μεταξύ των ασθενών με ΑΣ αναγνωρίζουν την καρδιαγγειακή νόσο (ΚΑΝ) ως την πρωταρχική αιτία θανάτου^[267,268]. Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν ότι η ΑΣ σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικής καρδιοπάθειας, εγκεφαλοαγγειακής νόσου, υπέρτασης, περιφερικής αγγειακής νόσου, καθώς και εμφράγματος του μυοκαρδίου^[370,371]. Συνολικά, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η αυξημένη καρδιαγγειακή θνησιμότητα σε ασθενείς με ΑΣ μπορεί να σχετίζεται με λειτουργικές ή δομικές αρτηριακές ανωμαλίες. Η διαλεύκανση, λοιπόν, των μηχανισμών, καθώς και ο προσδιορισμός νέων βιοδεικτών αυξημένου κινδύνου εμφάνισης αθηροσκλήρωσης σε ασθενείς με ΑΣ είναι σημαντικά τόσο για την πρόληψη, όσο και για τη θεραπεία της νόσου.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η HDL εκφέρει μια σειρά από αντιαθηρογόνες ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται στη σύσταση του μορίου της^[198,248,372]. Έχει δειχθεί, όμως, ότι υπό συνθήκες οξείας φάσης, καθώς και σε χρόνια φλεγμονή, η πρωτεϊνική σύσταση της HDL μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε δυσλειτουργική και συχνά προ-αθηρογόνο^[189,373]. Παράλληλα, μελέτες υποστηρίζουν ότι κατά τη διάρκεια των χρόνιων, φλεγμονωδών, ρευματικών παθήσεων, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), επηρεάζονται οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL. Ειδικότερα, οι ασθενείς με ΣΕΛ και ΡΑ βρέθηκε να έχουν προφλεγμονώδη HDL^[263,264]. Επιπρόσθετα, η ικανότητα της HDL/αποΑ-I να επάγει εκροή χοληστερόλης ήταν μειωμένη τόσο σε ασθενείς με ΡΑ με ενεργή νόσο, όσο και σε ασθενείς με ΣΕΛ, όπου η νόσος ήταν υπό έλεγχο^[265,374].

Δεδομένης της παρατηρούμενης διαταραχής στις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL σε ασθενείς με PA και ΣΕΛ^[263-265,374], είναι δελεαστικό να γενικευθεί η ύπαρξη τέτοιας διαταραχής και σε άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, όπως η ΑΣ. Παρομοίως με την ΑΣ, τόσο η PA, όσο και ο ΣΕΛ έχουν σχετιστεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο^[269]. Σε αντίθεση με την ΑΣ, η PA και ο ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών αυτοαντισωμάτων που μπορεί να προκαλούν συστηματική φλεγμονή^[375,376]. Αυτή η παθολογία είναι απύσασ σε ασθενείς με ΑΣ^[375,376]. Επομένως, οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL στην ΑΣ είναι πιθανό να μην επηρεάζονται και η αυξημένη προδιάθεση ανάπτυξης ΚΑΝ, που παρατηρείται στους ασθενείς με ΑΣ, να μη σχετίζεται με δυσλειτουργία της HDL.

Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση αξιολογήθηκαν οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL ασθενών με ΑΣ, σε σχέση με τις ιδιότητες της HDL ατόμων αναφοράς. Ειδικότερα, οι HDL ασθενών με ΑΣ χαρακτηρίστηκαν ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, με τη δοκιμασία DCF^[304,305], η οποία έχει χρησιμοποιηθεί προηγούμενα για τον χαρακτηρισμό της HDL ασθενών με PA και ΣΕΛ^[264]. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η ικανότητα της HDL ασθενών με ΑΣ να επάγει την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα κύτταρα, που θεωρείται μία από τις σημαντικότερες, αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL^[377,378]. Περαιτέρω, υπολογίστηκε η δραστηριότητα των ενζύμων PON1 και MPO, καθώς έχει δειχθεί από προηγούμενες μελέτες ότι οι μειωμένες αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL μπορεί να σχετίζονται με αλλαγές στη δραστηριότητα των ενζύμων PON1 και MPO^[379-382].

4.1.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων μελέτης

Τριάντα πέντε ασθενείς με ΑΣ συγκρίθηκαν με τριάντα πέντε άτομα αναφοράς, ώστε να καθοριστούν τυχόν διαφοροποιήσεις ως προς τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL αυτών. Κατά μέσον όρο, οι ασθενείς παρουσίαζαν χρόνια συμπτώματα, ενώ η νόσος θεωρείτο ανενεργή (BASDAI <4). Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν θεραπεία έναντι του TNF-α (ινφλιξιμάμπη, infliximab), έξι λάμβαναν, επίσης DMARD (μεθοτρεξάτη, methotrexate) και ένας λάμβανε, επίσης μεθυλοπρεδνιζολόνη (methylprednisolone). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης. Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΑΣ και των ατόμων αναφοράς. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση, εκτός αν υποδεικνύονται διαφορετικά.

	Ασθενείς, n=35	Άτομα αναφοράς, n=35	p*	p** (προσαρμοσμένο)
Ηλικία, y	46,1 ± 13,3	45,3 ± 12,6	0,840	
Άντρες, n (%)	30 (86)	26 (74)	0,232	
Διάρκεια της νόσου, y	19,0 ± 11,1	—		
BMI, kg/m ²	24,9 ± 4,8	24,7 ± 2,3	0,806	
CRP, mg/dL	4,9 ± 3,2	3,7 ± 3,0	0,110	
BASDAI (0-10)	3,2 ± 0,7	—		
Χρήση anti-TNF-α, n (%)	35 (100)	—		
Χρήση DMARD, n (%)	6 (17)	—		
Χρήση στεροειδών, n (%)	1 (3)	—		
Καπνιστές, n (%)	13 (37)	12 (34)	0,803	
Καρδιαγγειακή νόσος, n (%)	1 (3)	1 (3)	1,000	
Υπέρταση, n (%)	8 (23)	3 (9)	0,101	
Σακχαρώδης Διαβήτης, n (%)	1 (3)	0	0,314	
Παχυσαρκία, n (%)	5 (14)	1 (3)	0,088	
Χρήση στατινών, n (%)	9 (26)	3 (9)	0,057	
Ολική χοληστερόλη, mg/dL	170,1 ± 38,9	182,5 ± 49,6	0,249	0,232
HDL-C, mg/dL	49,9 ± 17,2	49,3 ± 13,7	0,855	0,627
LDL-C, mg/dL	105,4 ± 40,2	110,3 ± 48,8	0,649	0,491
Τριγλυκερίδια, mg/dL	89,1 ± 45,6	114,8 ± 54,1	0,035	0,005***
αποΑ-I, mg/dL	144,1 ± 49,8	165,7 ± 42,0	0,054	0,202

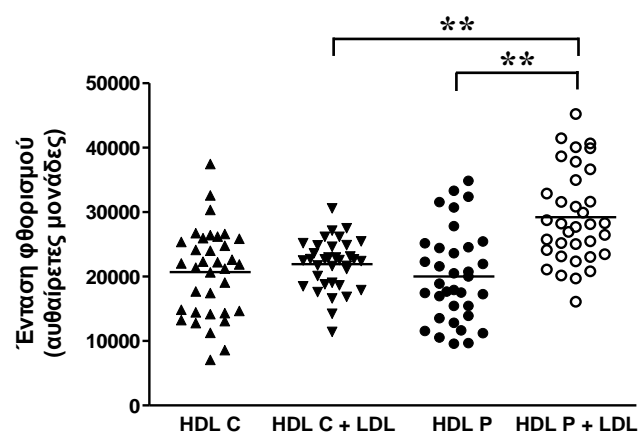
Το *p υπολογίστηκε με το t-τεστ (Student's t-test) για τις συνεχείς μεταβλητές και με το Χ²-τεστ (chi-square test) για τη συσχέτιση των κατηγορικών μεταβλητών. Το **p υπολογίστηκε με το γενικό γραμμικό μοντέλο μονομεταβλητής ανάλυσης, συμπεριλαμβάνοντας ως ανεξάρτητες μεταβλητές το κάπνισμα, το φύλο, την ΚΑΝ, την υπέρταση, την παχυσαρκία, τον διαβήτη, και τη χρήση στατινών. ***Η προσαρμογή για κάθε μεταβλητή ανεξάρτητα από τις άλλες οδήγησε σε τιμές p μεταξύ 0,016 και 0,047. y: χρόνια, n: αριθμός, BMI: δείκτης μάζας σώματος (body mass index), CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein), BASDAI: Δείκτης Δραστηριότητας της ΑΣ (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), anti-TNF-α: έναντι του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (anti-tumor necrosis factor-α), DMARD: τροποποιητικά της νόσου αντιρρευματικά φάρμακα (disease-modifying antirheumatic drugs), HDL-C: HDL-χοληστερόλη (HDL-cholesterol), LDL-C: LDL-χοληστερόλη (LDL-cholesterol).

Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI), καθώς και ο αριθμός των καπνιζόντων ήταν παρόμοιος μεταξύ των ασθενών με ΑΣ και των ατόμων αναφοράς. Επιπλέον, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την παρουσία ΚΑΝ, υπέρτασης, διαβήτη και παχυσαρκίας μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης. Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και της αποΑ-I προσδιορίστηκαν στον απομονωμένο ορό αίματος των ατόμων μελέτης (βλ. παρ. 3.3-3.5). Η συγκέντρωση της HDL-C προσδιορίστηκε στην απομονωμένη HDL από τον ορό αίματος (βλ. παρ. 3.1), ενώ η LDL-C υπολογίστηκε, με βάση την εξίσωση Friedewald^[383]. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα τριγλυκεριδίων των

ασθενών με ΑΣ ήταν μειωμένα συγκριτικά με τα άτομα αναφοράς, ενώ οι άλλες τιμές μέτρησης δε διέφεραν στατιστικά μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης. Παρόμοια λιπιδαιμικά προφίλ μεταξύ ασθενών με ΑΣ με ανενεργή νόσο και ατόμων αναφοράς έχουν παρατηρηθεί προηγουμένως^[384]. Επίσης, η σχετιζόμενη με τη νόσο θεραπεία, ακολουθούμενη από βελτίωση της δραστηριότητας της νόσου, έχει δείχθει ότι οδηγεί σε βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ των ασθενών με ΑΣ^[385-387].

4.1.2 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα

Οι HDL που απομονώθηκαν από τον ορό αίματος των ατόμων μελέτης (βλ. παρ. 3.1) ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων ή να απενεργοποιούν τα οξειδωμένα λιπίδια της ανθρώπινης LDL, με τη δοκιμασία DCF (2',7'-διχλωροφλουορεσκεΐνη). Απουσία της οξειδωμένης LDL (oxLDL), οι HDL τόσο των ασθενών με ΑΣ, όσο και των ατόμων αναφοράς παρήγαγαν παρόμοια επίπεδα σήματος φθορισμού, υποδηλώνοντας ότι οι ασθενείς και τα άτομα αναφοράς βρίσκονται στην ίδια οξειδωτική κατάσταση. Ωστόσο, παρουσία της oxLDL σημειώθηκε μεγάλη αύξηση του σήματος φθορισμού όταν χρησιμοποιήθηκαν HDL ασθενών με ΑΣ, συγκριτικά με τις HDL των ατόμων αναφοράς, υποδεικνύοντας ότι η ικανότητα της HDL να καταστέλλει το οξειδωτικό δυναμικό της oxLDL είναι μειωμένη στους ασθενείς με ΑΣ ($p < 0,0001$, Σχήμα 4.1). Η παρατηρηθείσα διαφορά οφείλεται αποκλειστικά στη μειωμένη λειτουργικότητα των HDL των ασθενών με ΑΣ, καθώς χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα HDL-C για όλα τα δείγματα μελέτης.

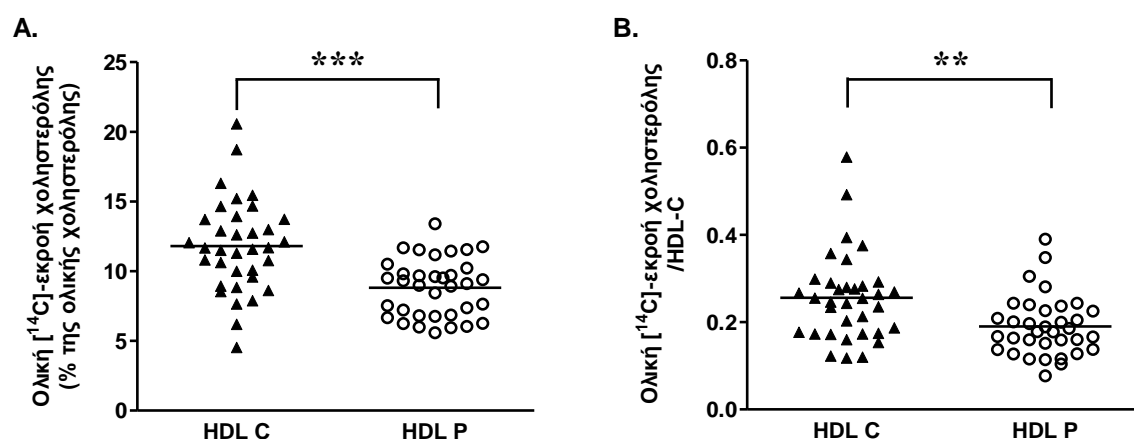


Σχήμα 4.1: Αντιοξειδωτική ικανότητα των HDL ασθενών με ΑΣ και των ατόμων αναφοράς. Η ένταση φθορισμού ως αποτέλεσμα της οξείδωσης της DCFH από την υπό εξέταση HDL (50 µg/mL HDL-C), παρουσία ή απουσία της oxLDL (100 µg/mL LDL-C), μετρήθηκε σε

φασματοφθορισμόμετρο. Όλες οι δοκιμασίες DCF πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. *** $p < 0,0001$ ως προς τις HDL των ατόμων αναφοράς παρουσία oxLDL και ως προς τις HDL των ασθενών με ΑΣ απουσία oxLDL. C: άτομα αναφοράς (controls), P: ασθενείς με ΑΣ (patients), DCFH: 2',7'-διχλωροδιϋδροφλουορεσκίνη, oxLDL: οξειδωμένη LDL (oxidized LDL).

4.1.3 Επαγόμενη εκροή κυτταρικής χοληστερόλης μέσω της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα

Για να χαρακτηριστούν περαιτέρω οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL ασθενών με ΑΣ, εξετάστηκε η ικανότητα της HDL να προάγει εκροή κυτταρικής χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η ικανότητα της HDL να επάγει την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774, τα οποία είχαν επωαστεί με cPT-cAMP (το οποίο επάγει την έκφραση του ABCA1 και αυξάνει την έκφραση του ABCG1), παρουσία 2 % v/v απομονωμένης HDL από τον ορό αίματος ασθενών με ΑΣ ή ατόμων αναφοράς (βλ. παρ. 3.21). Με αυτή τη δοκιμασία μετράται η ολική εκροή χοληστερόλης- μέσω ABCG1, SR-BI, ABCA1, παθητικής διάχυσης- που μπορεί να επάγει η HDL από μακροφάγα J774. Διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα των HDL ασθενών με ΑΣ να επάγουν εκροή κυτταρικής χοληστερόλης ήταν μειωμένη σε σχέση με αυτή των ατόμων αναφοράς ($p < 0,0001$, Σχήμα 4.2A). Η ικανότητα των HDL ασθενών με ΑΣ να προάγουν εκροή κυτταρικής χοληστερόλης παρέμεινε μειωμένη, ακόμα και όταν οι τιμές της εκροής χοληστερόλης κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της HDL-C ($p < 0,005$, Σχήμα 4.2B).



Σχήμα 4.2. Επαγόμενη εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία 2% v/v HDL ασθενών με ΑΣ και ατόμων αναφοράς. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. (A) Οι τιμές εκφράζονται ως το % ποσοστό της εκροής χοληστερόλης της ολικής χοληστερόλης των κυττάρων. (B) Οι τιμές εκφράζονται ως το % ποσοστό της εκροής χοληστερόλης της ολικής χοληστερόλης των κυττάρων διαιρεμένες με τη συγκέντρωση της HDL-C σε mg/dL. ** p

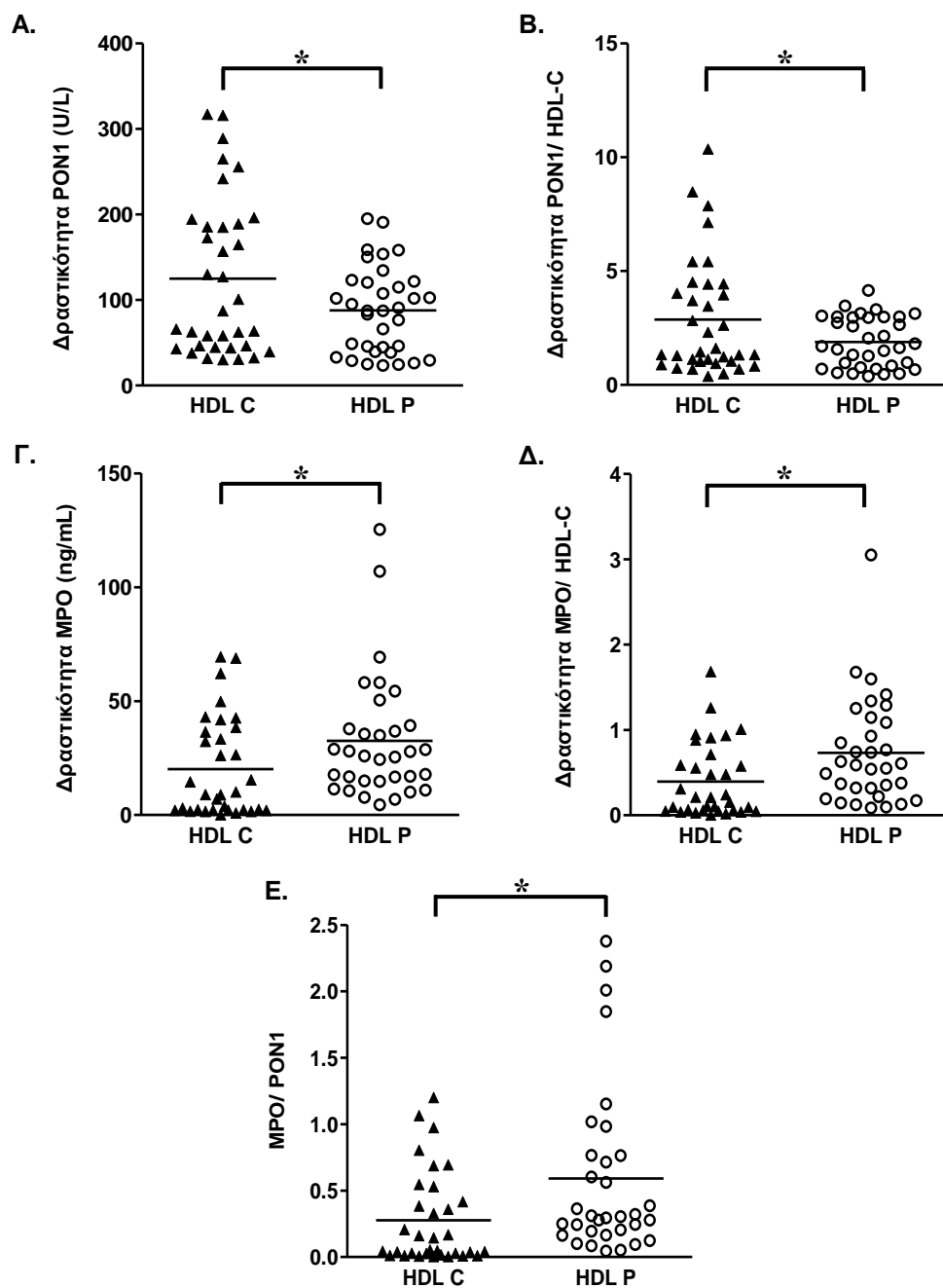
<0,005, ***p <0,0001 ως προς τις HDL των ατόμων αναφοράς C: άτομα αναφοράς, P: ασθενείς με ΑΣ.

4.1.4 Προσδιορισμός της δραστικότητας των ενζύμων PON1 και MPO της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα

Για να διευκρινιστεί εάν οι διαταραγμένες αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL, που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ΑΣ, οφείλονται σε αλλαγές της πρωτεϊνικής σύστασης του μορίου της HDL, προσδιορίστηκαν οι δραστικότητες των ενζύμων PON1 και MPO. *In vitro* μελέτες υποδεικνύουν ότι η PON1 μπορεί να αναστείλει τη βιολογική δραστικότητα της ελαφρώς oxLDL και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (oxPL), υποδηλώνοντας ότι μπορεί να υδρολύει τα oxPL^[220,221]. Επιπρόσθετα, η μειωμένη δραστικότητα της PON1 έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου καρδιακών συμβαμάτων σε ανθρώπους^[388]. Αντίθετα, η MPO καταλύει την τοποειδική οξείδωση της apoA-I και έχει συνδεθεί με μειωμένη εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1^[380,381].

Η μέτρηση των δραστικότητων των ενζύμων PON1 και MPO, χρησιμοποιώντας ίσους όγκους HDL για κάθε δείγμα, έδειξε ότι η δραστικότητα της PON1 ήταν σημαντικά μειωμένη ($p < 0,05$), ενώ η δραστικότητα της MPO σημαντικά αυξημένη ($p < 0,05$) στους ασθενείς με ΑΣ, σε σχέση με τα άτομα αναφοράς (Σχήμα 4.3A, Γ). Η κανονικοποίηση των δραστικότητων των ενζύμων PON1 και MPO ως προς τα επίπεδα της HDL-C οδήγησε στο ίδιο αποτέλεσμα ($p < 0,05$, Σχήμα 4.3B, Δ). Η συσχέτιση της κανονικοποιημένης δραστικότητας του ενζύμου PON1 ή MPO με την αντιοξειδωτική ικανότητα ή την ικανότητα εκροής χοληστερόλης των HDL ασθενών με ΑΣ αξιολογήθηκε με τον συντελεστή συσχέτισης Spearman. Από την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι η αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου MPO συσχετίστηκε θετικά με τη μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα των HDL ασθενών με ΑΣ ($r 0,359, p = 0,020$).

Σε μια μελέτη έχει προταθεί ότι ο λόγος MPO/PON1 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν χρήσιμο δείκτη για την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, μέσω διαφοροποιήσεων των ιδιοτήτων της HDL^[389]. Όπως παριστάνεται στο σχήμα 4.2E, ο λόγος MPO/PON1 είναι σημαντικά αυξημένος για τους ασθενείς με ΑΣ συγκριτικά με των ατόμων αναφοράς ($p < 0,05$).



Σχήμα 4.3. Δραστικότητες των ενζύμων PON1 και MPO σε ασθενείς με ΑΣ και άτομα αναφοράς. Οι δραστικότητες των ενζύμων PON1 και MPO μετρήθηκαν, χρησιμοποιώντας 5 και 80 μ L απομονωμένης HDL, αντίστοιχα. **(Α)** Οι τιμές δραστικότητας της PON1 εκφράζονται σε U/L. **(Β)** Οι τιμές δραστικότητας της PON1 εκφράζονται σε U/L διά τη συγκέντρωση της HDL-C σε mg/dL. **(Γ)** Οι τιμές δραστικότητας της MPO εκφράζονται σε ng/mL. **(Δ)** Οι τιμές δραστικότητας της MPO της HDL εκφράζονται σε ng/mL διά τη συγκέντρωση της HDL-C σε mg/dL. **(Ε)** Ο λόγος MPO/PON1. * $p < 0,05$ ως προς τις HDL των ατόμων αναφοράς. C: άτομα αναφοράς, P: ασθενείς με ΑΣ.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η HDL ασθενών με ΑΣ παρουσιάζει διαταραγμένες αντιαθηρογόνες ιδιότητες. Η διαταραχή των ιδιοτήτων

της HDL μπορεί να συνιστά μια μοριακή σύνδεση μεταξύ της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας και της καρδιαγγειακής νόσου.

4.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης αποΑ-I σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων

Για τη μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων στο μόριο της αποΑ-I κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη ενός απλού και αποδοτικού πρωτοκόλλου έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης. *In vitro* έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές στρατηγικές για την παραγωγή της αποΑ-I από ευκαρυωτικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων αδενοϊού-κυττάρων εντόμου (adenovirus-insect cell system)^[121,390] και των κυττάρων ωοθηκών κινεζικού χάμστερ (Chinese hamster ovary cell system)^[391,392]. Η παραγωγή της αποΑ-I μέσω των συστημάτων αυτών περιλαμβάνει πολύπλοκα και χρονοβόρα βήματα. Στο εργαστήριο υπήρχε ήδη αναπτυγμένο πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων, για την αποΕ^[312], η οποία ομοιάζει δομικά, αλλά και λειτουργικά με την αποΑ-I^[92,173,393-396]. Επιπρόσθετα, διάφορα βακτηριακά συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία για την παραγωγή της αποΑ-I^[397-399]. Για όλους τους παραπάνω λόγους, επελέγη η έκφραση της πρωτεΐνης μέσω βακτηριακού συστήματος. Για την παραγωγή της αποΑ-I μέσω αυτού του συστήματος, κατασκευάστηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET32a-αποΑ-I3C.

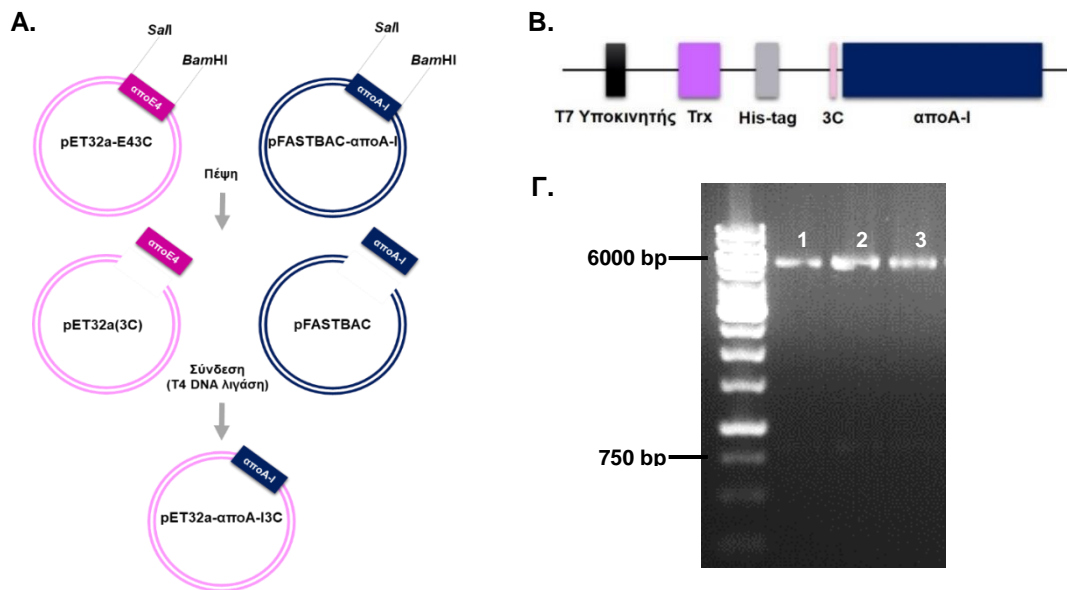
Οι αρχικοί πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φορέα pET32a-αποΑ-I3C, ήταν οι pFASTBAC-αποΑ-I και pET32a-E43C^[312]. Ο φορέας pFASTBAC-αποΑ-I περιέχει την πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία της ανθρώπινης αποΑ-I και είναι ιδανικός για την παραγωγή της πρωτεΐνης μέσω ευκαρυωτικού συστήματος. Ο φορέας pET32a-E43C περιέχει την πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία της ανθρώπινης αποΕ4 συντηγμένη ανοδικά στο 5' άκρο της με μία ετικέτα θειορεδοξίνης (Trx) και μία ετικέτα έξι ιστιδινών (6x His-tag). Στο σημείο σύντηξης έχει προστεθεί μία αλληλουχία αμινοξέων που αναγνωρίζεται για πέψη από την πρωτεάση 3C^[312]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. παρ. 3.12.2), οι φορείς κλωνοποίησης pET επιτρέπουν τη γρήγορη και σε υψηλή απόδοση παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης, μέσω βακτηριακών συστημάτων. Επιπλέον, η ύπαρξη των ετικετών, καθώς και η περιοχή που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση 3C,

διευκολύνουν τον καθαρισμό και την απομόνωση της πρωτεΐνης, αντίστοιχα, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Οπότε, η cDNA αλληλουχία της αποE4 στον φορέα pET32a-E43C αντικαταστάθηκε από τη cDNA αλληλουχία της αποA-I.

Ακολούθως, η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου. Για να επιβεβαιωθεί η δομική ακεραιότητα της παραχθείσας αποA-I μέσω του βακτηριακού συστήματος, η πρωτεΐνη χαρακτηρίστηκε με βιοφυσικές τεχνικές. Ως μόριο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ήδη χαρακτηρισμένη, ανασυνδυασμένη αποA-I που έχει παραχθεί από την κυτταρική σειρά αστροκυτώματος ανθρώπου HTB-13, μέσω του συστήματος επιμόλυνσης με αδενοϊό (εργαστήριο Δρ. Β. Ζαννή, Ιατρική Σχολή, Τομέας Μοριακής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Βοστώνης)^[123,124].

4.2.1 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET32a-αποA-I3C

Για την κατασκευή του φορέα pET32a-αποA-I3C, εκμεταλλευτήκαμε το γεγονός ότι οι πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης pET32a-E43C και pFASTBAC-αποA-I φέρουν τις αλληλουχίες πέψης για τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Sal*I εκατέρωθεν των ενθεμάτων αποE4 και αποA-I. Αρχικά, οι φορείς επώαστηκαν με τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Sal*I και τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Κατόπιν, οι ζώνες ενδιαφέροντος, pET32a(3C) και αποA-I, απομονώθηκαν από την πηκτή (βλ. παρ. 3.10.2) και ακολούθησε η σύνδεση των τμημένων DNA, τα οποία είχαν συμπληρωματικά μονόκλινα άκρα, με τη χρήση του ενζύμου λιγάση (Σχήμα 4.4A). Ο νέος ανασυνδυασμένος φορέας που προέκυψε (Σχήμα 4.4B) πολλαπλασιάστηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* XL1-Blue και απομονώθηκε εκ νέου από αυτά. Η αντίδραση σύνδεσης των τμημάτων DNA επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, κατόπιν επώασης του φορέα pET32a-αποA-I3C με τα ίδια ένζυμα περιορισμού (Σχήμα 4.4Γ). Όπως παρουσιάζεται στην πηκτή αγαρόζης (Σχήμα 4.4Γ), από κάθε αντίδραση πέψης του φορέα (διαδρομές 1, 2 και 3) προέκυψαν δύο ζώνες DNA, οι οποίες αντιστοιχούν στον φορέα pET32a(3c) (~6000 bp) και την αποA-I (~730 bp). Η αλληλουχία του νέου ανασυνδυασμένου φορέα επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση DNA (DNA sequencing).



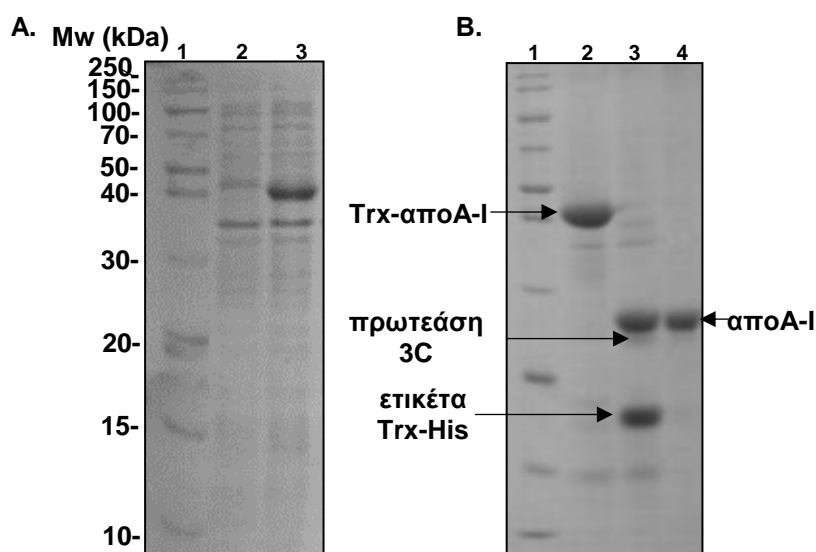
Σχήμα 4.4. Κατασκευή του φορέα pET32a-αποA-I3C και ανάλυσή του σε πηκτή αгарόζης. (Α) Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή του φορέα pET32a-αποA-I3C. (Β) Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του φορέα που εκφράζει την apoA-I συντηγμένη με τις ετικέτες θειορεδοξίνης (Trx) και έξι ιστιδινών (6x His-tag). (Γ) Ανάλυση σε πηκτή 1% w/v αгарόζης των προϊόντων πέψης του φορέα pET32a-αποA-I3C με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και SalI.

4.2.2 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της apoA-I άγριου τύπου σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων

Για την έκφραση της ανασυνδυασμένης apoA-I άγριου τύπου, βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21-Gold(DE3) μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pET32a-αποA-I3C. Ο υποκινητής T7, που περιέχεται στον φορέα κλωνοποίησης, επιτρέπει την έκφραση της συντηγμένης με την ετικέτα θειορεδοξίνης (Trx) πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα, κατόπιν επώασης των κυττάρων με 0,5 mM IPTG, για 2 h και 30 min, στους 37 °C (Σχήμα 4.5A). Η θειορεδοξίνη οδηγεί την παραγόμενη πρωτεΐνη στο διαλυτό κλάσμα, μετά τη λύση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.

Η ύπαρξη της ετικέτας έξι ιστιδινών (6x His-tag) στην περιοχή σύντηξης μεταξύ της θειορεδοξίνης και της apoA-I διευκολύνει τον καθαρισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης (Trx-αποA-I) μέσω χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου. Η έκλυση της χιμαιρικής apoA-I επετεύχθη με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου στην περιοχή συγκεντρώσεων 150-1.000 mM. Λόγω της ύπαρξης της αλληλουχίας αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C ανοδικά του αμινο-τελικού άκρου της apoA-I, γίνεται δυνατή η απομάκρυνση του συντήγματος

Trx-His από την απομονωμένη χιμαιρική πρωτεΐνη, μετά από επώαση αυτής με την πρωτεάση 3C. Η πρωτεάση 3C υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ γλουταμίνης (Q) και γλυκίνης (G) στην περιοχή LEVLFQGP, αφήνοντας τέσσερα αμινοξικά κατάλοιπα (γλυκίνη (G), προλίνη (P), γλυκίνη (G), σερίνη (S)) στο αμινοτελικό άκρο της αποΑ-I. Τελικά, η απαλλαγμένη από το σύντηγμα αποΑ-I απομονώθηκε ύστερα από έναν δεύτερο καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ώστε να εμποδιστεί η συμπλοκοποίηση της τμημένης αποΑ-I με την άτμητη χιμαιρική αποΑ-I ή την τμημένη ετικέτα Trx-His. Κατά τη διέλευση του διαλύματος πέψης από τη στήλη ρητίνης νικελίου, συγκρατήθηκαν στη στήλη το σύντηγμα Trx-His (18 kDa), η πρωτεάση 3C, που φέρει επίσης ετικέτα ιστιδίνης (~24 kDa) και μέρος της χιμαιρικής αποΑ-I (46 kDa) που τυχόν δεν τμήθηκε από την πρωτεάση. Αντίθετα, το κλάσμα της αποΑ-I (28 kDa), που δεν έφερε πλέον την ετικέτα 6x His, διήλθε από τη στήλη και συνελέγη καθαρό (σχήμα 4.5B). Το διάλυμα που περιείχε την αποΑ-I υπέστη εκτεταμένη διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 5 mM NH_4HCO_3 και ακολούθως λυοφιλοποιήθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C .



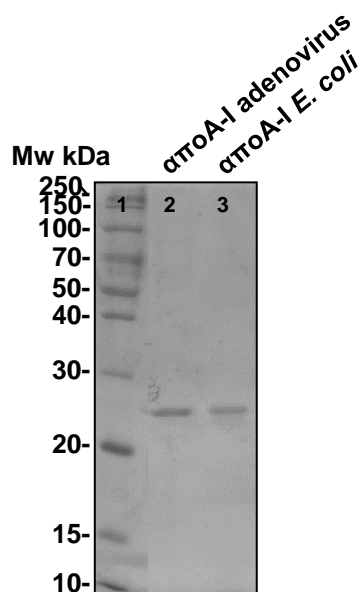
Σχήμα 4.5. Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης αποΑ-I. (A) Βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21-Gold(DE3) μετασχηματισμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pET32a-αποΑ-I3C. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37°C και η επαγωγή της έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης έγινε με 0,5 mM IPTG, για 2 h και 30 min. Διαδρομή 1: Μοριακός δείκτης, Διαδρομή 2: Βακτηριακά κύτταρα πριν της επαγωγή με IPTG, Διαδρομή 3: Βακτηριακά κύτταρα μετά την επαγωγή με IPTG. (B) Απομόνωση της απαλλαγμένης, από την ετικέτα θειορεδοξίνης-ιστιδίνης, αποΑ-I, μέσω ρητίνης Ni^{2+} -NTA. Διαδρομή 1: Μοριακός δείκτης, Διαδρομή 2: Σύντηγμένη πρωτεΐνη (Trx-αποΑ-I) έπειτα από τον πρώτο καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, μέσω ρητίνης Ni^{2+} -NTA, Διαδρομή 3:

Πέψη της Tγx-αποA-I με την πρωτεάση 3C, Διαδρομή 4: Τμημένη αποA-I που δεν προσδέθηκε στη ρητίνη Ni²⁺-NTA, έπειτα από τον δεύτερο καθαρισμό.

4.2.3 Βιοφυσική ανάλυση της παραγόμενης μέσω βακτηριακών κυττάρων ανασυνδυσασμένης αποA-I

Η παραχθείσα μέσω του βακτηριακού συστήματος, ανασυνδυσασμένη αποA-I (αποA-I_{E. coli}) χαρακτηρίστηκε ως προς τη δομική της ακεραιότητα με βιοφυσικές τεχνικές και συγκρίθηκε με την ανασυνδυσασμένη αποA-I που έχει παραχθεί από κύτταρα θηλαστικού, μέσω του συστήματος επιμόλυνσης με αδενοϊό (αποA-I_{adenovirus}). Ειδικότερα, συγκρίθηκαν οι ιδιότητες των αποA-I_{E. coli} και αποA-I_{adenovirus} στα πλαίσια της δευτεροταγούς δομής, της θερμοδυναμικής σταθερότητας, καθώς και της έκτασης της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στον διαλύτη.

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε πρόσφατα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη (βλ. παρ. 3.18.1). Στο σχήμα 4.6 παρουσιάζεται η ανάλυση δειγμάτων της αποA-I, που έχουν παραχθεί μέσω των διαφορετικών συστημάτων έκφρασης, έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, μετά τη διαδικασία αποδιάταξης-επαναδιάταξης αυτών με υδροχλωρική γουανιδίνη. Όπως προκύπτει από την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, οι αποA-I που χρησιμοποιήθηκαν στα βιοφυσικά πειράματα ήταν περισσότερο από 95% καθαρές.



Σχήμα 4.6. Ανάλυση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων ανασυνδυσασμένης αποA-I που έχουν παραχθεί μέσω διαφορετικών συστημάτων έκφρασης. Διαδρομή 1:

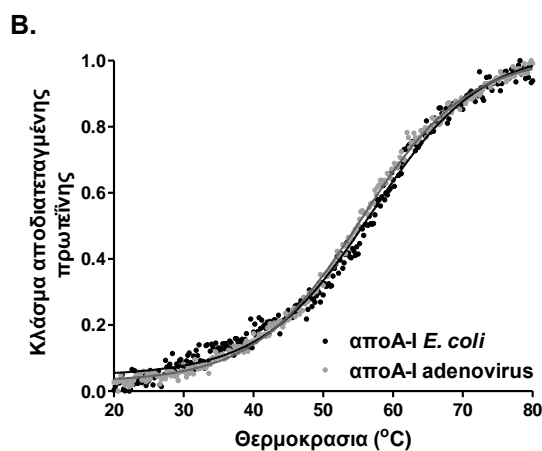
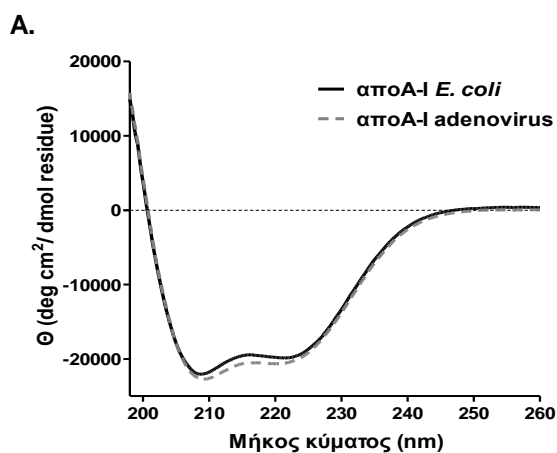
Μοριακός δείκτης, Διαδρομή 2: Ανασυνδυασμένη αποΑ-I, παραχθείσα από κύτταρα θηλαστικών, μέσω του συστήματος επιμόλυνσης με αδενοϊό (αποΑ-Iadenovirus), Διαδρομή 3: Ανασυνδυασμένη αποΑ-I, παραχθείσα μέσω του συστήματος βακτηριακών κυττάρων (αποΑ-I.E. coli).

Η δευτεροταγής δομή των αποΑ-I.E. coli και αποΑ-Iadenovirus μελετήθηκε, καταγράφοντας τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (circular dichroism, CD) των πρωτεϊνών στην περιοχή του άπυ υπεριώδους (198-260 nm). Τα φάσματα CD των παραπάνω πρωτεϊνών παρουσιάζονται στο σχήμα 4.7Α και αποτελούν τους μέσους όρους τουλάχιστον τριών πειραμάτων. Η μορφή του σχήματος του φάσματος CD της αποΑ-I.E. coli ήταν αντίστοιχη με αυτή της αποΑ-Iadenovirus. Το εκατοστιαίο ποσοστό ελικότητας για τις δύο πρωτεΐνες υπολογίστηκε στα 222 nm, βάσει της εξίσωσης: $\% \alpha\text{-helix}_{222\text{nm}} = ([\theta]_{222} + 3.000) / (36.000 + 3.000) \times 100$ ^[337]. Το περιεχόμενο ποσοστό σε α-έλικα για την αποΑ-I.E. coli ήταν 60,2%, ποσοστό συγκρίσιμο με το 58,6% που υπολογίστηκε για την αποΑ-Iadenovirus, αλλά και εντός του εύρους τιμών (40-68%) που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία για την αποΑ-I, παραγόμενη είτε από βακτηριακά συστήματα έκφρασης, είτε από συστήματα έκφρασης μέσω θηλαστικών^[85,123,400-403].

Η θερμοδυναμική σταθερότητα της αποΑ-I.E. coli έναντι της αποΑ-Iadenovirus μελετήθηκε, καταγράφοντας τα προφίλ της θερμικής και χημικής αποδιάταξης των πρωτεϊνών (Σχήμα 4.7Β, Γ). Οι καμπύλες της θερμικής αποδιάταξης των πρωτεϊνών που προέκυψαν, παρακολουθώντας την αλλαγή της μοριακής ελλειπτικότητας στα 222 nm συναρτήσει της θερμοκρασίας (20-80 °C), παρουσιάζονται στο σχήμα 4.7Β. Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκαν σε πρότυπη σιγμοειδή καμπύλη Boltzmann και οι τιμές της θερμοκρασίας τήξης στο μέσο της μετάβασης (T_m), της φαινόμενης μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH_v) και του δείκτη συνεργιστικότητας (n) καθορίστηκαν, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.3. Οι αριθμητικές τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων που υπολογίστηκαν για το μόριο της αποΑ-I.E. coli ήταν αντίστοιχες με τις τιμές που υπολογίστηκαν για την αποΑ-Iadenovirus, εκτός από τη θερμοκρασία T_m (Σχήμα 4.7Β). Παρότι, η αποΑ-I.E. coli αποδιάταχθηκε θερμικά σε θερμοκρασία μεγαλύτερη κατά ~1,5 °C, σε σχέση με την αποΑ-Iadenovirus, η τιμή αυτή είναι εντός του εύρους τιμών (52-64 °C) που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία για την αποΑ-I^[72,78,124,404,405]. Στο σχήμα 4.7Γ παρουσιάζονται οι καμπύλες χημικής αποδιάταξης των αποΑ-I.E. coli και αποΑ-Iadenovirus που προέκυψαν, καταγράφοντας τις αλλαγές στο σήμα φθορισμού των καταλοίπων θρυπτοφάνης, κατόπιν τιτλοδότησης με

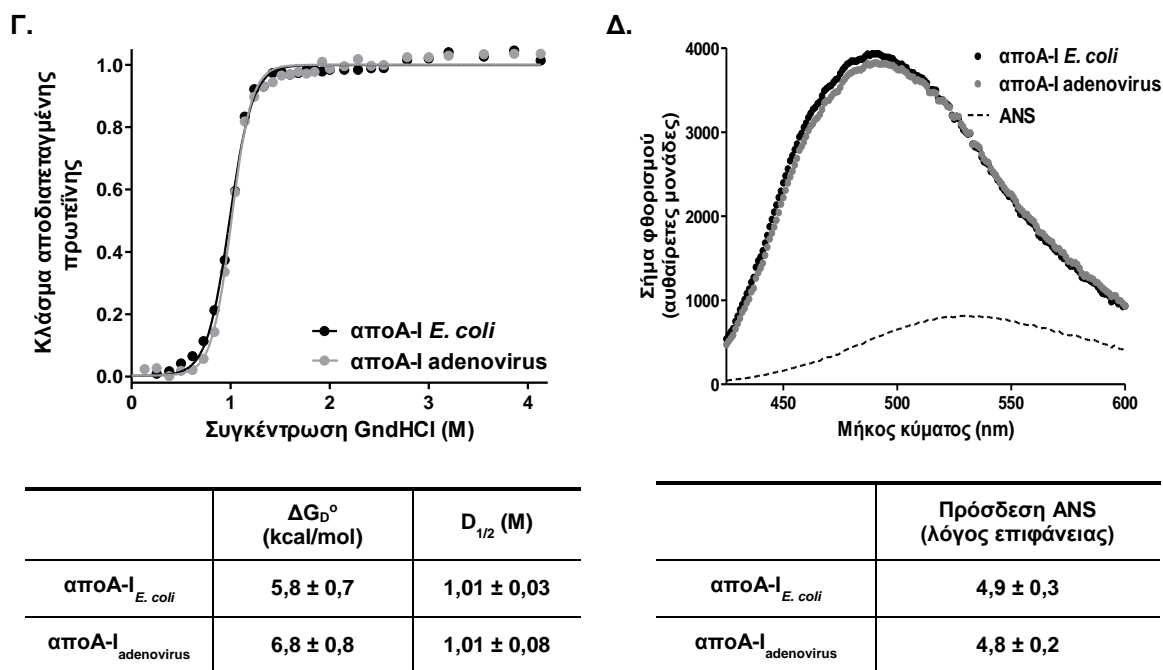
αυξανόμενες ποσότητες υδροχλωρικής γουανιδίνης (GndHCl). Έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης δύο φάσεων, υπολογίστηκαν η φαινόμενη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG_D°) και η συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης στο μέσο της μετάβασης ($D_{1/2}$), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.4. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι που υπολογίστηκαν για τα δύο μόρια ήταν συγκρίσιμες (Σχήμα 4.7Γ).

Η έκταση της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στον διαλύτη μελετήθηκε, λαμβάνοντας το φάσμα φθορισμού του ιχνηθέτη ANS παρουσία ή απουσία των αποA-I *E. coli* και αποA-I adenovirus. Η πρόσδεση του ANS στην αποA-I *E. coli* οδήγησε σε σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, καθώς και σε μετατόπιση του μεγίστου του εκπεμπόμενου φθορισμού σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift) (Σχήμα 4.7Δ). Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι το ANS προσδέεται στις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης. Η αποA-I *E. coli* και η αποA-I adenovirus παρουσίασαν την ίδια μεταβολή του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS, καθώς και αντίστοιχα ποσοστά έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών τους στο διαλύτη.



	α-έλικα ₂₂₂ (%)
αποA-I <i>E. coli</i>	58,6 ± 2,3
αποA-I adenovirus	60,2 ± 2,6

	T_m (°C)	ΔH_v (kcal/mol)	n
αποA-I <i>E. coli</i>	57,5 ± 0,4	28,9 ± 2,9	5,5 ± 0,5
αποA-I adenovirus	55,8 ± 0,5 ^{###}	28,6 ± 1,1	5,6 ± 0,6



Σχήμα 4.7. Φυσικοχημικές ιδιότητες των apoA-I_{E. coli} και apoA-I_{adenovirus}. Όλες οι αριθμητικές τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση. **(Α)** Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) των apoA-I στο άπω υπεριώδες (198-260 nm), στους 25 °C. Τα φάσματα CD αποτελούν τους μέσους όρους τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Το περιεχόμενο % ποσοστό σε α -έλικα υπολογίστηκε με βάση τη μοριακή ελλειπτικότητα στα 222 nm. **(Β)** Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των apoA-I. Το σήμα CD των πρωτεϊνών καταγράφηκε στα 222 nm, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία σε ένα εύρος τιμών από 20 έως 80 °C. Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη κατάσταση. Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία, ενώ οι καμπύλες προέκυψαν από την προσαρμογή των σημείων σε μοντέλο αποδιάταξης δύο σταδίων κατά Boltzmann (συμπαγής γραμμή). Οι παράμετροι T_m , ΔH και n υπολογίστηκαν, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.3. **(Γ)** Προφίλ χημικής αποδιάταξης των apoA-I. Το σήμα του εγγενούς φθορισμού των καταλοίπων θρυπτοφάνης καταγράφηκε (διέγερση: 295 nm, λήψη φάσματος: 310-420 nm) κατόπιν πιλοδότησης με αυξανόμενες ποσότητες 8 M GndHCl. Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη δομή. Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία. Η συμπαγής γραμμή αναπαριστά την προσαρμογή των σημείων σε μοντέλο σιγμοειδούς καμπύλης Boltzmann. Οι παράμετροι ΔG_D° και $D_{1/2}$ υπολογίστηκαν, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.4. **(Δ)** Φάσματα φθορισμού του ANS παρουσία ή απουσία των apoA-I. Τα φάσματα ελήφθησαν από τα 425 έως τα 600 nm, έπειτα από διέγερση των δειγμάτων στα 395 nm. Ως δείκτης του ποσοστού έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών των πρωτεϊνών στο διαλύτη καθορίστηκε ο λόγος της επιφάνειας του φάσματος του ANS παρουσία πρωτεΐνης προς την επιφάνεια του φάσματος του ANS απουσία πρωτεΐνης. $###p < 0,0005$ ως προς την apoA-I_{E. coli}.

Συμπερασματικά, τα πειραματικά δεδομένα αναδεικνύουν πως η παραγόμενη μέσω του βακτηριακού συστήματος, ανασυνδυασμένη αποΑ-I εμφανίζει αντίστοιχες φυσικοχημικές ιδιότητες με την ανασυνδυασμένη αποΑ-I, που έχει παραχθεί από κύτταρα θηλαστικών, μέσω του συστήματος επιμόλυνσης με αδενοϊό. Επομένως, στις μελέτες που περιγράφονται παρακάτω, ως μόριο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδυασμένη αποΑ-I *E. coli*.

4.3 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων της απολιποπρωτεΐνης A-I που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C

Είναι ευρέως γνωστό ότι υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της HDL-C στο πλάσμα και του κινδύνου ανάπτυξης ΚΑΝ^[184,406,407]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα υποδεικνύουν ότι η λειτουργικότητα της HDL είναι πιο συναφής με την αθηροπροστασία^[186,408,409]. Σημαντικές αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL αποτελούν, μεταξύ άλλων, η απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αγγείων^[180], η αναστολή της οξειδωσης της LDL^[190,196], καθώς και η διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου^[187]. Πολλές από τις ιδιότητες της HDL μεσολαμβάνται από την αποΑ-I.

Η αποΑ-I αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση, τη δομή, τη ρύθμιση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα και όπως ήδη αναφέρθηκε, στις αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της^[173,362,410,411]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι κληρονομήσιμες σημειακές μεταλλάξεις της αποΑ-I οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πρόωρης αθηροσκλήρωσης, ακόμα και ανεξαρτήτως των επιπέδων της HDL-C στο πλάσμα^[174,177,178,412,413]. Παρ' όλα αυτά, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες δεν έχουν εξετάσει εάν η σημειακή μετάλλαξη επιφέρει αλλαγές στη δομή της αποΑ-I που σχετίζονται με διαφοροποιήσεις στη λειτουργικότητα τόσο της αποΑ-I όσο και της HDL, οδηγώντας κατά αυτόν τον τρόπο σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυσικά απαντώμενες σημειακές μεταλλάξεις Leu144Arg (L144R), Ala164Ser (A164S) και Leu178Pro (L178P) της αποΑ-I, οι οποίες έχουν εντοπιστεί σε ισπανικό, δανέζικο και ολλανδικό πληθυσμό, αντίστοιχα, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ ή/και με χαμηλά

επίπεδα HDL-C στο πλάσμα^[176-178]. Συγκεκριμένα, η αποA-I[L144R] σχετίζεται με πολύ χαμηλά επίπεδα HDL-C στο πλάσμα, αλλά όχι με πρόωρη αθηροσκλήρωση^[176,177]. Αντίθετα, η αποA-I[A164S] σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας, καθώς και με αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, χωρίς όμως να επηρεάζει τα επίπεδα της HDL-C στο πλάσμα^[177]. Ενώ, η αποA-I[L178P] σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα HDL-C και οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αύξηση του πάχους του αρτηριακού τοιχώματος και σε πρόωρη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου^[178].

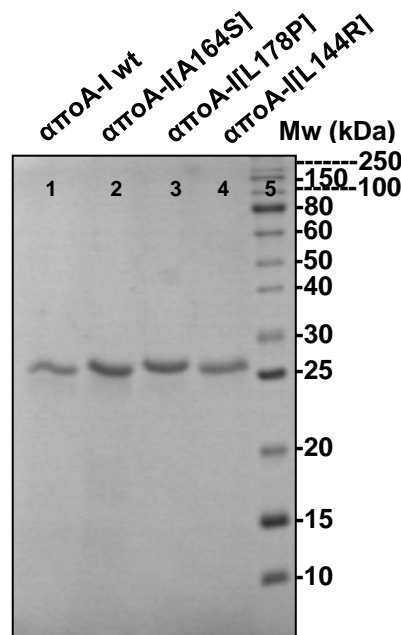
Δεδομένου του παθολογικού φαινοτύπου που παρουσιάζουν οι παραπάνω σημειακές μεταλλάξεις, η διασαφήνιση της σχέσης της δομής της αποA-I που φέρει υποκατάσταση ενός και μόνο αμινοξέος με τη λειτουργικότητα της αποA-I και της HDL κρίνεται ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Στην παρούσα, λοιπόν, διατριβή διερευνήθηκε πως οι σημειακές μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P της αποA-I, επηρεάζουν τη δομή, τη βιογένεση, τον μεταβολισμό και τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες των αποA-I/HDL.

4.3.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός των αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων

Για να μελετηθεί η επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη δομή και τη λειτουργία της αποA-I, παρασκευάστηκαν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P]. Ο πλασμιδιακός φορέας pET32a-αποA-I3C, ο οποίος κωδικοποιεί την έκφραση της ανθρώπινης αποA-I, χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την εισαγωγή των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη cDNA αλληλουχία της αποA-I. Οι μεταλλαξιγενέσεις πραγματοποιήθηκαν με τον σχεδιασμό συμπληρωματικών μορίων εκκινητών που έφεραν τις μεταλλάξεις στις επιθυμητές θέσεις της κωδικής αλληλουχίας της αποA-I και τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης τυποποιημένης συσκευασίας βιολογικής αποτίμησης (kit) QuickChange II XL site direct mutagenesis (Agilent Technologies), σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η εισαγωγή των μεταλλάξεων στη cDNA αλληλουχία της αποA-I επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση DNA (DNA sequencing) των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων.

Οι ανασυνδυασμένες απολιποπρωτεΐνες, αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P], παρήχθησαν μέσω του βακτηριακού συστήματος έκφρασης

που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.2, όπως η αποΑ-I *E. coli* (αποΑ-I άγριου τύπου). Στο σχήμα 4.8 παρουσιάζεται η ανάλυση δειγμάτων των πρωτεϊνών αποΑ-I [L144R], αποΑ-I [A164S] και αποΑ-I [L178P], σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου (wild type, wt), κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, μετά τη διαδικασία αποδιάταξης-επαναδιάταξης αυτών με υδροχλωρική γουανιδίνη (βλ. παρ. 3.18.1).



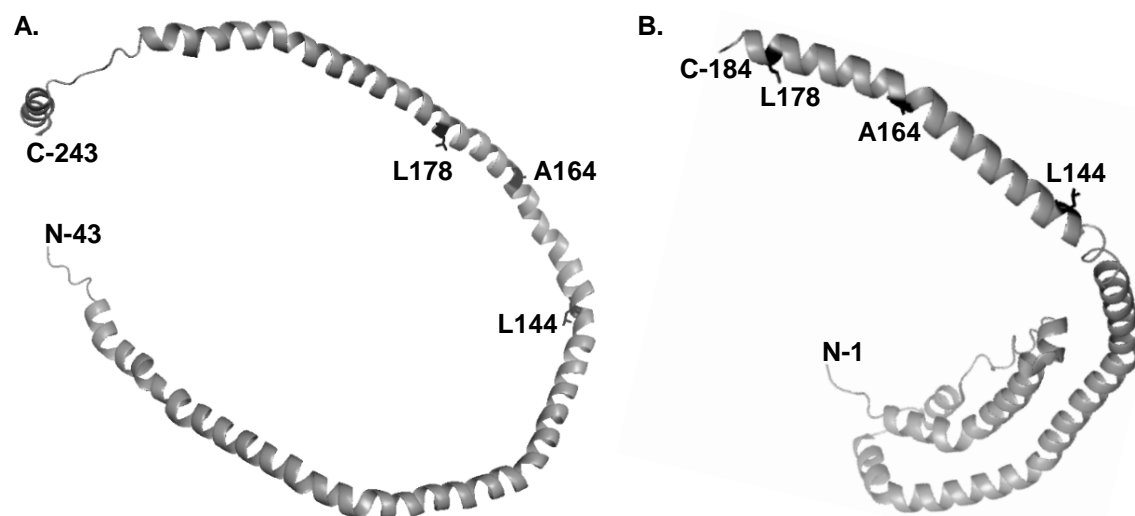
Σχήμα 4.8. Ανάλυση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I μετά τη διαδικασία αποδιάταξης-επαναδιάταξης. Διαδρομή 1: αποΑ-I wt, Διαδρομή 2: αποΑ-I [A164S], Διαδρομή 3: αποΑ-I [L178P], Διαδρομή 4: αποΑ-I [L144R], Διαδρομή 5: Μοριακός δείκτης.

Όπως προκύπτει από την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, οι αποΑ-I [L144R], αποΑ-I [A164S] και αποΑ-I [L178P] ήταν περισσότερο από 95% καθαρές και στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (28.419,9, 28.392,9 και 28.360,8 Da, αντίστοιχα), συγκρινόμενες με την αποΑ-I άγριου τύπου (28.376,9 Da).

4.3.2 Βιοφυσική ανάλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών αποΑ-I [L144R], αποΑ-I [A164S] και αποΑ-I [L178P]

Οι μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P της αποΑ-I εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξικά κατάλοιπα 1-187) και συγκεκριμένα στις έλικες 6 (αμινοξικά κατάλοιπα 143-164) και 7 (αμινοξικά κατάλοιπα 165-187), σύμφωνα με τα δεδομένα των δύο κρυσταλλικών δομών που είναι διαθέσιμες για την αποΑ-I, της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποΑ-I στο αμινο-

τελικό άκρο, αποA-I[Δ(1-43)] (PDB: 1AV1)^[79] και της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφής της αποA-I στο καρβοξυ-τελικό άκρο, αποA-I[Δ(185-243)] (PDB: 3R2P)^[80] (Εικόνα 4.1).



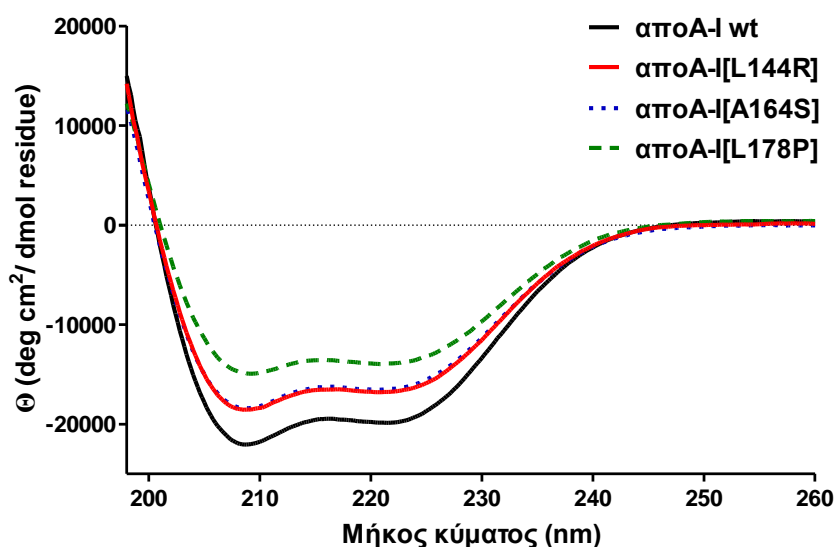
Εικόνα 4.1. Αναπαραστάσεις των κρυσταλλικών δομών της αποA-I, που αναδεικνύουν τις θέσεις που εντοπίζονται τα μεταλλαγμένα αμινοξικά κατάλοιπα L144, A164 και L178. Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της ελλειμματικής μορφής της αποA-I στο αμινο-τελικό άκρο, αποA-I[Δ(1-43)] (A) και της κρυσταλλικής δομής της ελλειμματικής μορφής της αποA-I στο καρβοξυ-τελικό άκρο, αποA-I[Δ(185-243)] (B) που ανδεικνύει τη θέση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P.

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] χαρακτηρίστηκαν με φυσικοχημικές τεχνικές και συγκρίθηκαν με την αποA-I άγριου τύπου, ώστε να εξεταστεί εάν οι μεταλλάξεις επηρεάζουν τη δομή της αποA-I, λόγω αλλαγών στις ενδο- και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών σε ελεύθερη λιπιδίων μορφή ή σε ανασυγκροτημένα HDL σωματίδια. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε εάν οι φυσικά απαντώμενες σημειακές μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P της αποA-I προκαλούν αλλαγές στη διαμορφωτική συμπεριφορά του μορίου της αποA-I, χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

4.3.2.1 Προσδιορισμός του ποσοστού ελικότητας των ελεύθερων λιπιδίων αποA-I άγριου τύπου, αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

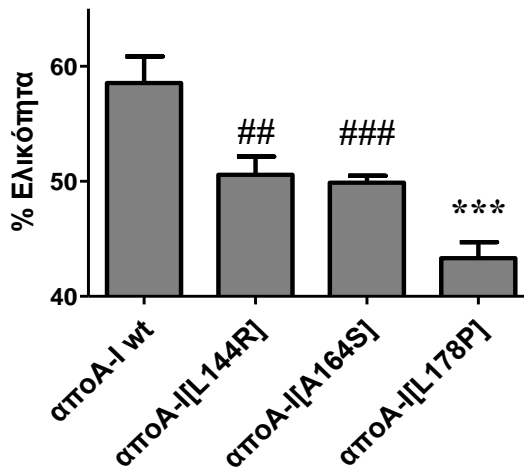
Για να διερευνηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη δευτεροταγή δομή της αποA-I, καταγράφηκαν τα φάσματα κυκλικού

διχρωϊσμού (CD) της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της στην περιοχή του άπω υπεριώδους (198-260 nm), στους 25 °C. Στο σχήμα 4.9 παρουσιάζονται τα φάσματα CD των παραπάνω πρωτεϊνών, καθένα από τα οποία αποτελεί τον μέσο όρο των φασμάτων CD που ελήφθησαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. Τα φάσματα CD και των τριών μεταλλάξεων της αποΑ-I εμφανίζουν παρόμοιο σχήμα φάσματος με την αποΑ-I άγριου τύπου, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για το μόριο αυτό, λόγω του μεγάλου ποσοστού α-έλικας που περιέχει^[79,80,85].



Σχήμα 4.9. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P].

Το εκατοστιαίο ποσοστό α-έλικας των αποΑ-I υπολογίστηκε με βάση τη μέση μοριακή ελλειπτικότητα στα 222 nm, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.2. Στο σχήμα 4.10 απεικονίζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της εκατοστιαίας ελικότητας των αποΑ-I, μεταλλαγμένων και άγριου τύπου, από τα πειραματικά δεδομένα που εξήχθησαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα.



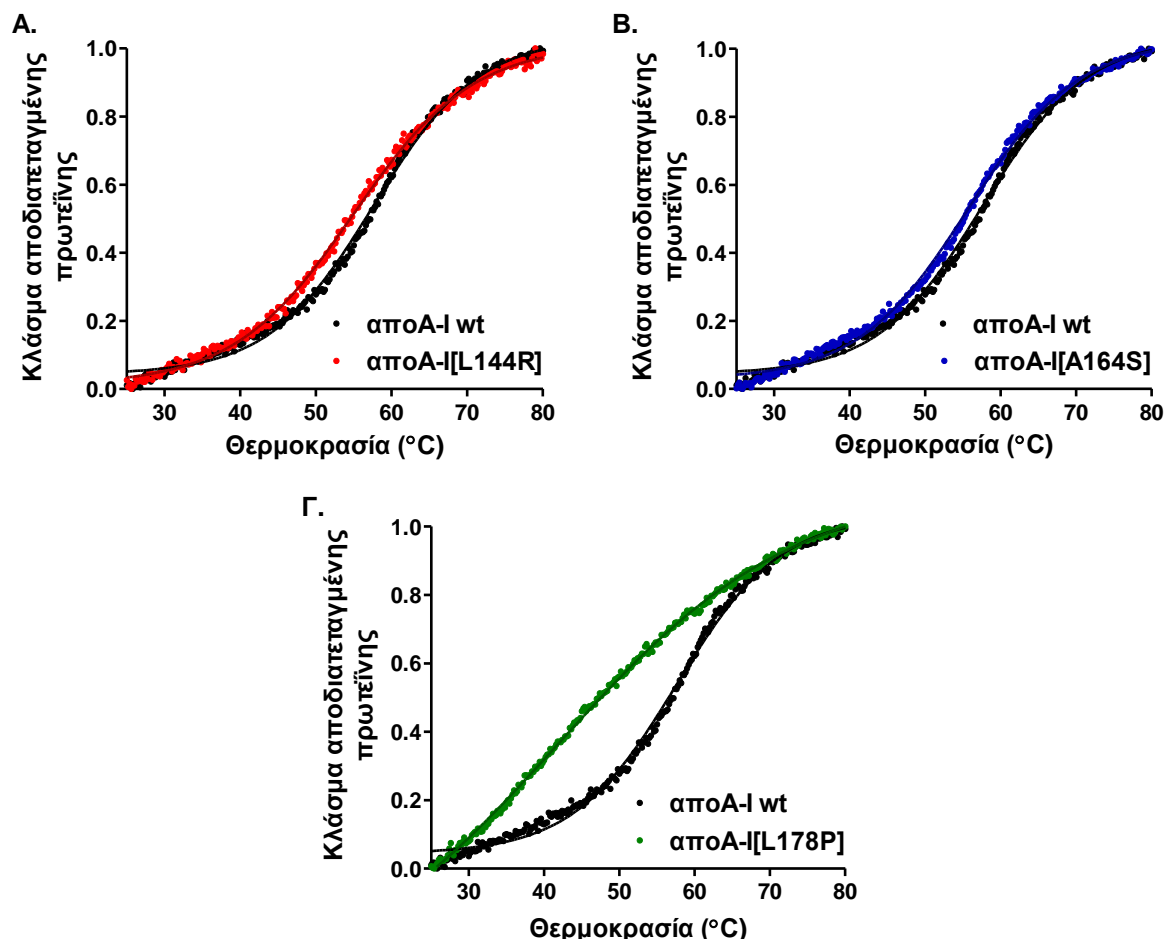
Σχήμα 4.10. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την εκατοστιαία ελικότητα των αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] σε αντιπαραβολή με την ελικότητα της αποΑ-I άγριου τύπου. ## $p < 0,005$, ### $p < 0,0005$, *** $p < 0,0001$ ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

Από τις μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού γίνεται φανερό πως η ελικότητα των τριών μεταλλάξεων είναι σημαντικά μειωμένη έναντι της ελικότητας της αποΑ-I άγριου τύπου. Τη μεγαλύτερη μείωση στο εκατοστιαίο ποσοστό α-έλικας παρουσιάζει η μετάλλαξη L178P, η οποία προκαλεί απώλεια κατά 15,3% της ελικότητας της πρωτεΐνης. Παρότι, η μείωση της ελικότητας για τη μετάλλαξη αυτή είναι αναμενόμενη, καθώς η προλίνη είναι μη συμβατή με τις α-έλικες, μια μείωση της τάξεως του 15% δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο σε τοπική διαταραχή της δομής της α-έλικας, αλλά υπονοεί γενικευμένες διαταραχές στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις L144R και A164S, οι παρατηρηθείσες κατά 8% και 8,7%, αντίστοιχα, μειώσεις στο περιεχόμενο ποσοστό α-έλικας της αποΑ-I υποδηλώνουν ότι οι δομικές αλλαγές που προκαλούνται από τις μεταλλάξεις εκτείνονται πέραν της περιοχής που εντοπίζονται αυτές.

4.3.2.2 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των ελεύθερων λιπιδίων αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου

Με δεδομένο ότι οι μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P διαταράσσουν τη δευτεροταγή δομή της αποΑ-I, διερευνήθηκε περαιτέρω η επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου της αποΑ-I. Για τον σκοπό αυτό, μελετήθηκε η θερμική αποδιάταξη των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I, σε σχέση με τη θερμική αποδιάταξη της αποΑ-I άγριου τύπου, παρακολουθώντας τις αλλαγές του σήματος του κυκλικού διχρωϊσμού στα 222 nm

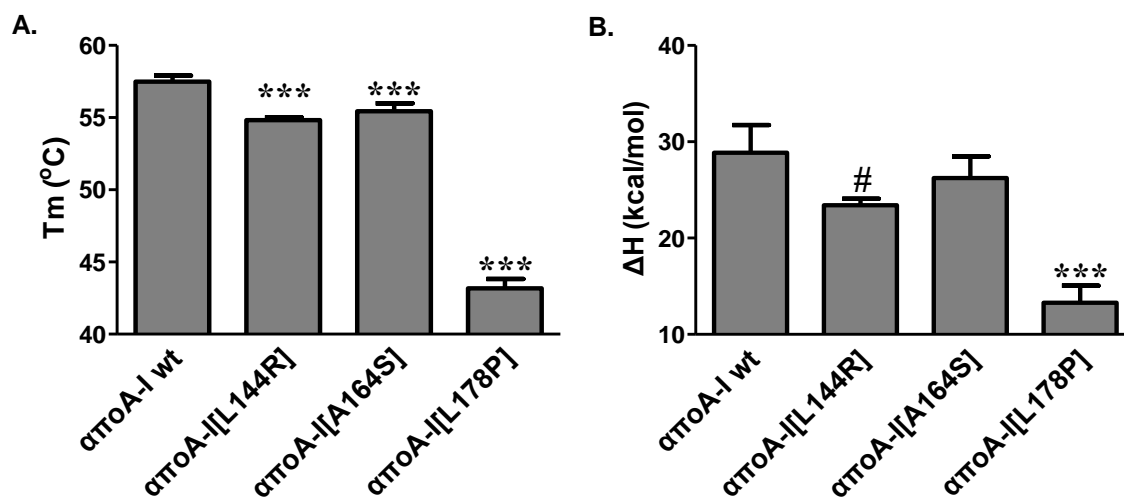
συναρτήσεως της αύξησης της θερμοκρασίας από τους 20 °C έως τους 80 °C, με ρυθμό μεταβολής 1 °C/min. Στο σχήμα 4.11 παρουσιάζονται οι καμπύλες θερμικής αποδιάταξης της κάθε μετάλλαξης, σε αντιπαραβολή με την καμπύλη θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου.



Σχήμα 4.11. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων apoA-I σε αντιπαραβολή με το προφίλ της apoA-I άγριου τύπου. Οι αλλαγές του σήματος CD των apoA-I καταγράφηκαν στα 222 nm, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία σε ένα εύρος τιμών από 20 έως 80 °C. Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη κατάσταση. Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία, ενώ οι καμπύλες που προέκυψαν από την προσαρμογή των σημείων σε σιγμοειδή καμπύλη Boltzmann αναπαρίστανται με τη συμπαγή γραμμή. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των apoA-I[L144R] (Α), apoA-I[A164S] (Β) και apoA-I[L178P] (Γ), σε αντιπαραβολή με το προφίλ της apoA-I άγριου τύπου.

Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν από το CD προσαρμόστηκαν σε πρότυπη σιγμοειδή καμπύλη Boltzmann, η οποία περιγράφει τη μετάβαση μεταξύ δύο καταστάσεων και οι θερμοδυναμικές παράμετροι των μορίων προσδιορίστηκαν με μια συμβατική ανάλυση van't Hoff, όπως περιγράφεται στην

παράγραφο 3.18.3. Στο σχήμα 4.12 παρουσιάζονται οι παρατηρούμενες μεταβολές της θερμοκρασίας τήξης, T_m , η οποία καθορίζει το μέσο σημείο της μετάβασης από τη διατεταγμένη κατάσταση της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη και της φαινόμενης μεταβολής της ενθαλπίας, ΔH , της μετάβασης, για κάθε μορφή της αποA-I, μεταλλαγμένης ή μη.



Σχήμα 4.12. Ραβδογράμματα που απεικονίζουν τις μεταβολές των θερμοδυναμικών παραμέτρων που παρουσίασαν οι αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] κατά τη θερμική τους αποδιάταξη, σε αντιπαραβολή με την αποA-I άγριου τύπου. (A) Θερμοκρασία τήξης (T_m) στο μέσο της μετάβασης της αποδιατάξης της αποA-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της. (B) Φαινόμενη μεταβολή της ενθαλπίας που παρουσίασαν οι αποA-I άγριου τύπου, αποA-I[L144R], αποA-I[A164S] και αποA-I[L178P] κατά τη θερμική τους αποδιάταξη. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων. # $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ ως προς την αποA-I άγριου τύπου.

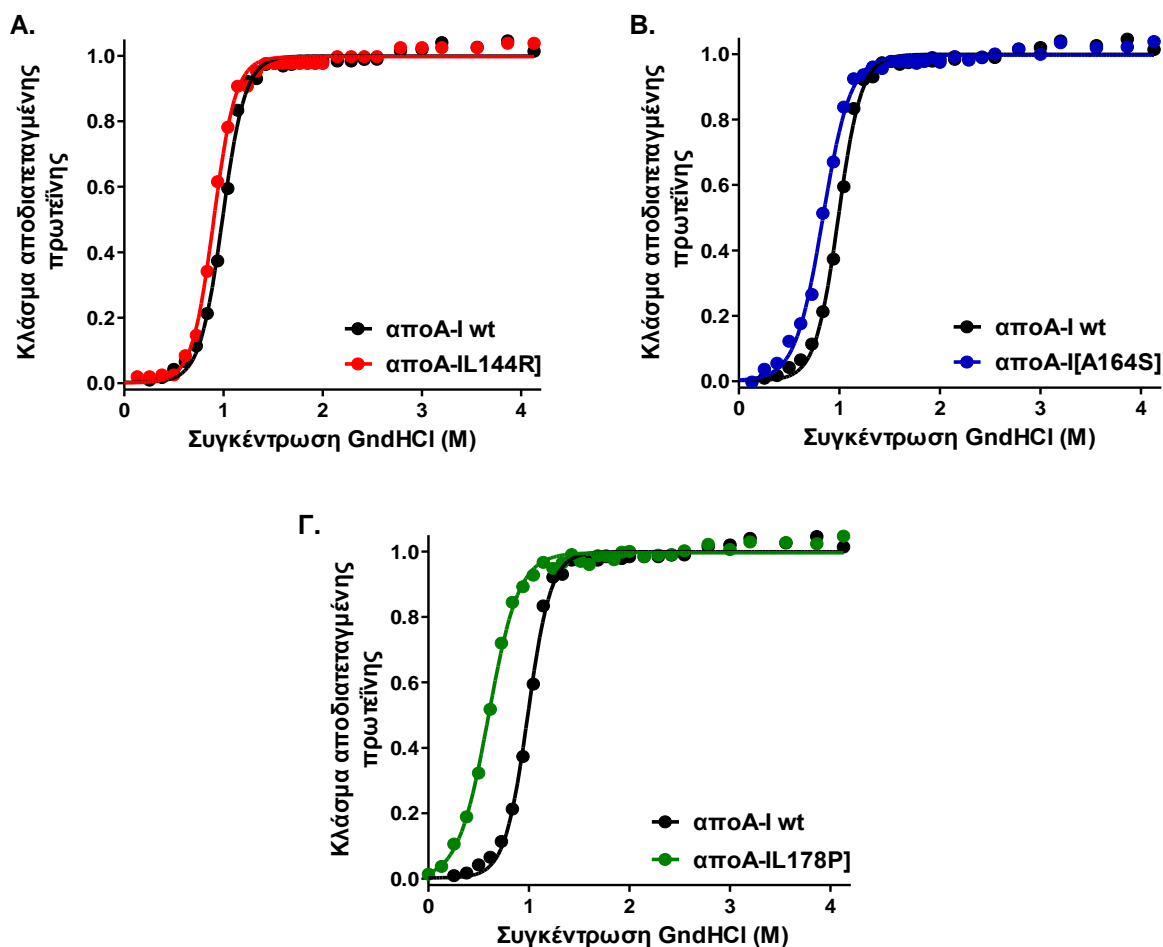
Η αποA-I[L144R] αποδιατάχθηκε θερμικά σε θερμοκρασία μικρότερη κατά ~ 3 °C συγκριτικά με την αποA-I άγριου τύπου, υποδεικνύοντας μια μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική ($p < 0,0001$) επίδραση της μετάλλαξης στη θερμοδυναμική σταθερότητα της πρωτεΐνης. Παράλληλα, η μείωση της φαινόμενης μεταβολής ενθαλπίας κατά 5,5 kcal/mol υποδηλώνει μια λιγότερο συνεργιστική μετάβαση κατά την αποδιάταξη της αποA-I[L144R], συγκρινόμενη με την αποA-I άγριου τύπου. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο προφίλ της θερμικής αποδιάταξης της αποA-I[L144R], σε σχέση με το προφίλ της αποA-I άγριου τύπου, υποδεικνύουν πως η εισαγωγή της μετάλλαξης οδηγεί σε μια λιγότερο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη A164S οδήγησε σε μια μικρή (~ 2 °C), αλλά αναπαραγώγιμη και στατιστικά σημαντική ($p < 0,0001$) μείωση της θερμοκρασίας τήξης (T_m) στο μέσο της αποδιάταξης, σε σχέση με την αποA-I άγριου τύπου,

προτείνοντας μια μικρή θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη L178P παρουσίασε τις μεγαλύτερες αποκλίσεις, σε σχέση με το προφίλ της θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου. Συγκεκριμένα, η αποΑ-I[L178P] αποδιατάχθηκε θερμικά σε θερμοκρασία μικρότερη κατά ~14 °C, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου και υπέστη μια λιγότερο συνεργιστική μετάβαση από τη διατεταγμένη κατάσταση της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου, όπως προκύπτει από τις καμπύλες θερμικής αποδιάταξης του σχήματος 4.11Γ. Η μειωμένη συνεργιστικότητα κατά τη θερμική αποδιάταξη της αποΑ-I[L178P] αντικατοπτρίζεται επίσης στη μείωση της φαινόμενης μεταβολής της ενθαλπίας της κατά ~15 kcal/mol, συγκριτικά με τη φαινόμενη μεταβολή της ενθαλπίας της αποΑ-I άγριου τύπου. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο προφίλ θερμικής αποδιάταξης της αποΑ-I[L178P] υποδηλώνουν πως η εισαγωγή της μετάλλαξης οδηγεί σε μια λιγότερο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης, καθώς και σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίησή της.

Συνολικά, τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στο γεγονός πως και οι τρεις σημειακές μεταλλάξεις της αποΑ-I επηρεάζουν τη θερμοδυναμική σταθερότητα και δομική πλαστικότητα της πρωτεΐνης.

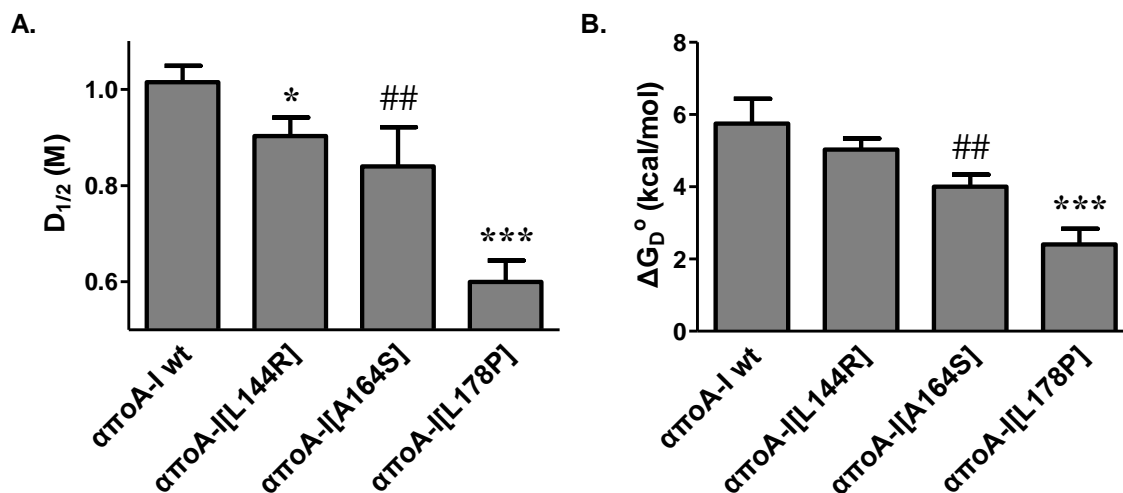
4.3.2.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης των αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση των μεταλλάξεων L144R, A164S, και L178P στη θερμοδυναμική σταθερότητα της πρωτεΐνης, μελετήθηκαν τα προφίλ της χημικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και συγκρίθηκαν με το προφίλ αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου. Εκμεταλλευόμενοι τον εγγενή φθορισμό των καταλοίπων θρυπτοφάνης, που εντοπίζονται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, καταγράφηκαν οι αλλαγές του σήματος φθορισμού αυτών κατόπιν τιτλοδότησης των δειγμάτων της αποΑ-I με αυξανόμενες ποσότητες υδροχλωρικής γουανιδίνης. Στο σχήμα 4.13 παρουσιάζονται τα κλάσματα των μεταλλαγμένων αποΑ-I που βρίσκονται σε αποδιατεταγμένη κατάσταση συναρτήσει της συγκέντρωσης της υδροχλωρικής γουανιδίνης, σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου.



Σχήμα 4.13. Προφίλ χημικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων apoA-I σε αντιπαραβολή με το προφίλ της apoA-I άγριου τύπου. Οι αλλαγές του σήματος του εγγενούς φθορισμού των καταλοίπων θρυπτοφάνης καταγράφηκαν, κατόπιν τιτλοδότησης των δειγμάτων της apoA-I με αυξανόμενες ποσότητες 8 M υδροχλωρικής γουανιδίνης (GndHCl). Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη κατάσταση. Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία, ενώ οι καμπύλες που προέκυψαν από την προσαρμογή των σημείων σε απλή μετάβαση Boltzmann μεταξύ δύο καταστάσεων αναπαρίστανται με τη συμπαγή γραμμή. Προφίλ χημικής αποδιάταξης των apoA-I[L144R] (A), apoA-I[A164S] (B) και apoA-I[L178P] (Γ), σε αντιπαραβολή με το προφίλ της apoA-I άγριου τύπου.

Έπειτα από προσαρμογή των δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης δύο φάσεων, υπολογίστηκαν η συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης (GndHCl) στο μέσο της μετάβασης ($D_{1/2}$) και η φαινόμενη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG_D°), για κάθε μορφή της apoA-I, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.4. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στο σχήμα 4.14.



Σχήμα 4.14. Ραβδογράμματα που απεικονίζουν τις μεταβολές των παραμέτρων που παρουσίασαν οι αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] κατά τη χημική τους αποδιάταξη, σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου. **(Α)** Συγκέντρωση της υδροχλωρικής γουανιδίνης (GndHCl) στο μέσο της μετάβασης, $D_{1/2}$, της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της. **(Β)** Φαινόμενη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG_D°) που παρουσίασαν οι αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] κατά τη χημική τους αποδιάταξη. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων. * $p < 0,01$, ## $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$ ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

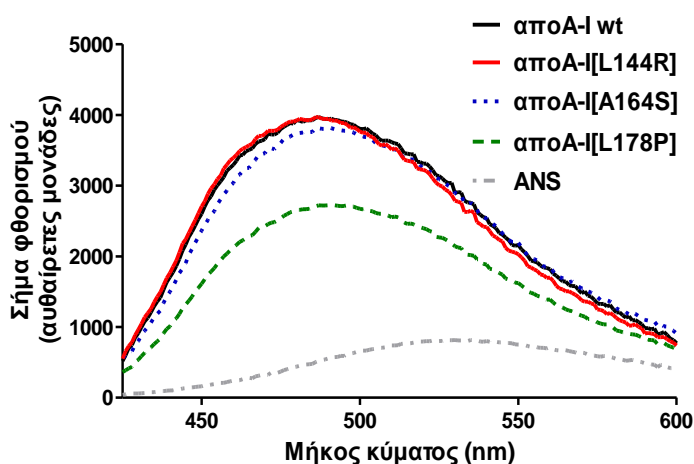
Η αποΑ-I[L144R] παρουσίασε φαινόμενη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs $5,0 \pm 0,3$ kcal/mol, τιμή που δε διαφέρει στατιστικά από τη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs της αποΑ-I άγριου τύπου ($5,8 \pm 0,7$ kcal/mol). Ωστόσο, αποδιατάχθηκε σε μικρότερη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης κατά $\sim 0,1$ M, υποδεικνύοντας μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$) επίδραση της μετάλλαξης στη θερμοδυναμική σταθερότητα της πρωτεΐνης. Η αποΑ-I[A164S] εμφάνισε μικρότερη φαινόμενη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG_D°) κατά ~ 2 kcal/mol και αποδιατάχθηκε χημικά σε μικρότερη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης κατά $\sim 0,2$ M, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου. Οι διαφοροποιήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η χημική αποδιάταξη της αποΑ-I[A164S] είναι λιγότερο συνεργιστική, συγκριτικά με την αποδιάταξη της αποΑ-I άγριου τύπου, καθώς και ότι η μετάλλαξη αυτή οδηγεί σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη L178P οδήγησε σε μετατόπιση της μετάβασης σε μικρότερη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης ($\sim 0,4$ M) και υπέστη μια λιγότερη συνεργιστική αποδιάταξη, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου, υποδεικνύοντας αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η μειωμένη συνεργιστικότητα κατά την αποδιάταξη της αποΑ-I[L178P] αποτυπώνεται και στη

μειωμένη κατά ~3,6 kcal/mol φαινόμενη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG_D°) που παρουσίασε η μετάλλαξη, σε σχέση με τη ΔG_D° που παρουσίασε η αποΑ-I άγριου τύπου. Συνολικά, η αποΑ-I[L178P] εμφανίζεται θερμοδυναμικά αποσταθεροποιημένη και δομικά διαφορετική από την αποΑ-I άγριου τύπου.

Συμπερασματικά, οι παρατηρούμενες μεταβολές κατά τη χημική αποδιάταξη των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου, υποδηλώνουν ότι και οι τρεις σημειακές μεταλλάξεις επηρεάζουν τη συνολική αναδίπλωση της πρωτεΐνης, οδηγώντας στη θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση της.

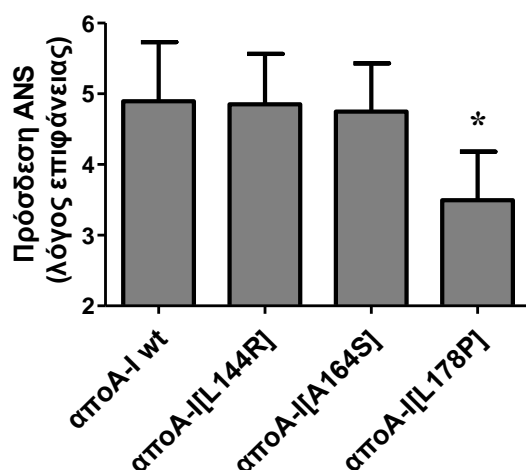
4.3.2.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών των αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] και αποΑ-I άγριου τύπου στον διαλύτη

Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλ. παρ. 1.4.3), η αποΑ-I φέρει χαρακτηριστικά «τηγμένης σφαιρικής» πρωτεΐνης. Συνεπώς, ένα ποσοστό των υδρόφοβων περιοχών της είναι φυσιολογικά εκτεθειμένες στο πολικό περιβάλλον του διαλύτη^[72,77]. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε εάν οι μεταλλάξεις L144R, A164S, και L178P επηρεάζουν το υδρόφοβο προφίλ της πρωτεΐνης, με τη χρήση του φθορίζοντος ιχνηθέτη ANS. Ο φθορίζον ιχνηθέτης ANS έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες για τη διερεύνηση του ποσοστού των υδρόφοβων περιοχών της αποΑ-I που είναι φυσιολογικά εκτεθειμένες στο διαλύτη, αλλά και ως μέτρο προσδιορισμού των πιθανών διαμορφωτικών αλλαγών στο μόριο της αποΑ-I, λόγω της ύπαρξης μεταλλάξεων^[401,414,415]. Τα φάσματα φθορισμού του ANS ελήφθησαν παρουσία ή απουσία της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της (Σχήμα 4.15).



Σχήμα 4.15. Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία της αποΑ-I άγριου τύπου και των αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P].

Οι μεταλλάξεις L144R και A164S παρουσίασαν αντίστοιχη με την αποΑ-I άγριου τύπου μεταβολή στον εκπεμπόμενο φθορισμό του ANS, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 4.16. Αντίθετα, η μετάλλαξη L178P οδήγησε σε στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$) μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS (Σχήμα 4.16), υποδηλώνοντας ότι η αποΑ-I[L178P] εκθέτει μικρότερη επιφάνεια υδρόφοβων περιοχών στον διαλύτη, συγκρινόμενη με την αποΑ-I άγριου τύπου. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως η μετάλλαξη L178P επιφέρει αλλαγές στην τριτοταγή διαμόρφωση του μορίου της αποΑ-I.



Σχήμα 4.16. Λόγοι του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS παρουσία της αποΑ-I άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της προς τον εκπεμπόμενο φθορισμό του ANS απουσία πρωτεΐνης. * $p < 0,01$ ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

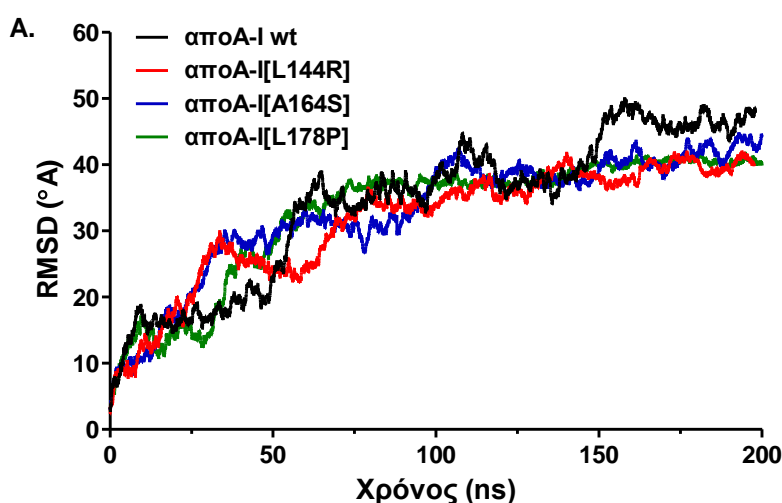
Συνολικά, από τη βιοφυσική ανάλυση διαφαίνεται ότι και οι τρεις φυσικά απαντώμενες σημειακές μεταλλάξεις της αποΑ-I επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης και οδηγούν στη θερμοδυναμική αποσταθεροποίησή της, με την L178P να επιφέρει τις μεγαλύτερες αλλαγές στο μόριο της αποΑ-I.

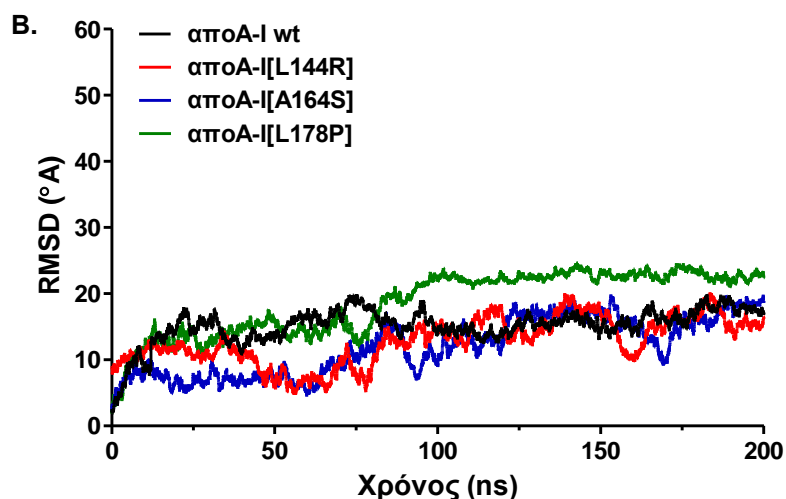
4.3.2.5 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη διαμορφωτική σταθερότητα της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamics simulations)

Για να μελετηθεί εκτενέστερα η επίδραση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη δομή και τη σταθερότητα της αποΑ-I, διεξήχθησαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής όλων των ατόμων του συστήματος, σε υδατικό περιβάλλον. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τις δύο διαθέσιμες κρυσταλλογραφικές δομές ακτινών-X της αποΑ-I, την ελεύθερη λιπιδίων ελλειμματική μορφή της αποΑ-I στο αμινο-τελικό άκρο, αποΑ-I[Δ(1-43)] (PDB: 1AV1)^[79] και την ελεύθερη λιπιδίων

ελλειμματική μορφή της αποΑ-I στο καρβοξυ-τελικό άκρο, αποΑ-I[Δ(185-243)] (PDB: 3R2P)^[80], αντίστοιχα, εισήχθησαν *in silico* τα τρία μεταλλαγμένα, αμινοξικά κατάλοιπα ($L \rightarrow R$, $A \rightarrow S$ και $L \rightarrow P$) στις θέσεις 144, 164 και 178. Οι μοριακές δυναμικές πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο NPT, υπό τις ίδιες συνθήκες, για 200 ns, για κάθε ένα από τα οχτώ συστήματα που παρασκευάστηκαν.

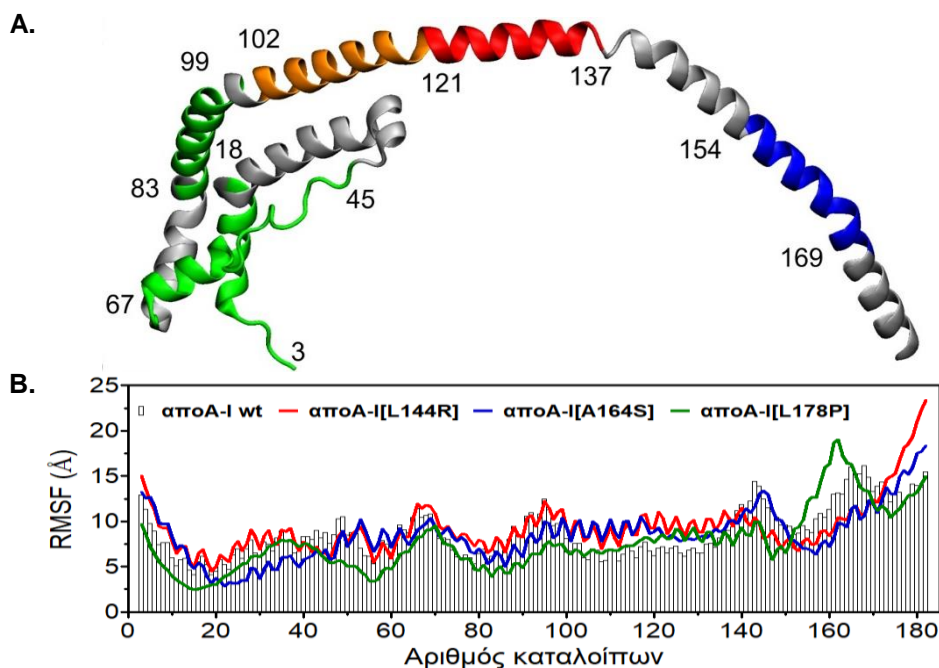
Οι υπολογισμοί για τις μεταβολές στις διαμορφώσεις των συστημάτων κατά τον χρόνο προσομοίωσης έγιναν με αναφορά στις κρυσταλλικές δομές των πρωτεϊνών που προέκυψαν μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας. Οι προσομοιώσεις που διεξήχθησαν με βάση της χαμηλής ανάλυσης δομές της αποΑ-I[Δ(1-43)] άγριου τύπου και των τριών μεταλλαγμένων μορφών της παρουσίασαν τιμές RMSD (root-mean-square deviation) της τάξεως των 40 Å, συγκριτικά με τις αρχικές κρυσταλλικές δομές (Σχήμα 4.17A). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι το μόριο της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I[Δ(1-43)] εμφανίζει αυξημένη ευελιξία. Αντιθέτως, οι προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τη δομή της αποΑ-I[Δ(185-243)] εμφάνισαν τιμές RMSD της τάξεως των 10-20 Å, σε σχέση με τις αρχικές κρυσταλλογραφικές συντεταγμένες των ατόμων (Σχήμα 4.17B), υποδεικνύοντας το σταθεροποιητικό ρόλο των αμινοξικών καταλοίπων του αμινο-τελικού άκρου της αποΑ-I, που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 3. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα αρκετών ερευνητικών μελετών που προτείνουν ότι το αμινο-τελικό άκρο της αποΑ-I συμβάλλει στη σταθεροποίηση της δομής ολόκληρου του μορίου της^[416,417].





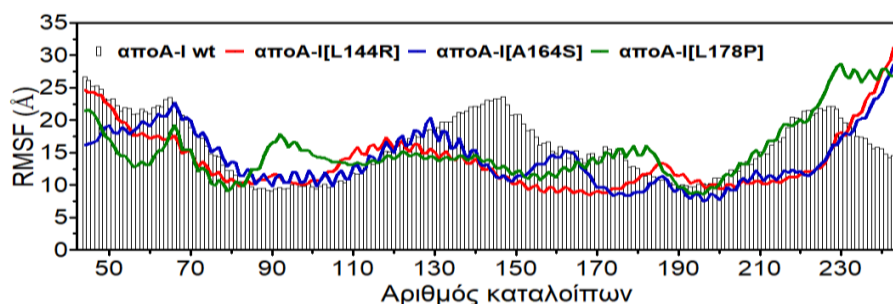
Σχήμα 4.17. RMSDs των ατόμων του πεπτιδικού σκελετού των πρωτεϊνών που εξήχθησαν από τις προσομοιώσεις (200 ns) των αποΑ-I[Δ(1-43)] και αποΑ-I[Δ(185-243)] και των αντίστοιχων μεταλλαγμένων μορφών τους. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν κάθε 10 ps. Γραφική αναπαράσταση των RMSD που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις των αποΑ-I[Δ(1-43)] άγριου τύπου (A) και αποΑ-I[Δ(185-243)] άγριου τύπου (B) και των αντίστοιχων μεταλλαγμένων μορφών τους.

Χρησιμοποιώντας τις διακυμάνσεις (root-mean-square fluctuation, RMSF) των ατόμων του πεπτιδικού σκελετού που εξήχθησαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, ως μέτρο της κινητικότητας της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση μεταξύ της αποΑ-I[Δ(185-243)] άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της (Σχήμα 4.18B). Συνολικά, και οι τρεις μεταλλάξεις παρουσίασαν μεταβολές στις ατομικές διακυμάνσεις, σε σχέση με την αποΑ-I[Δ(185-243)] άγριου τύπου, σε διαφορετικές όμως περιοχές της πρωτεΐνης. Ειδικότερα, αμφότερες οι μεταλλάξεις L144R και A164S προκάλεσαν αποσταθεροποίηση της περιοχής που εντοπίζονται τα κατάλοιπα 102-134 και 102-121, αντιστοίχως (απεικονίζονται με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα στο σχήμα 4.18A). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι αυτές οι δύο μεταλλάξεις σταθεροποίησαν τα κατάλοιπα 155-170 (απεικονίζονται με μπλε χρώμα στο σχήμα 4.18A), αλλά προκάλεσαν αποσταθεροποίηση στα κατάλοιπα 175-182. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η μετάλλαξη L178P σταθεροποίησε τα αμινο-τελικά κατάλοιπα 1-18, 45-67 και 83-99 (απεικονίζονται με πράσινο χρώμα στο σχήμα 4.18A), αλλά αποσταθεροποίησε τα κατάλοιπα 155-164 (Σχήμα 4.18B).



Σχήμα 4.18. Σχηματική και γραφική αναπαράσταση των τιμών RMSF που εξήχθησαν από τις προσομοιώσεις της apoA-I[Δ(185-243)] άγριου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της. **(Α)** Αναπαράσταση κορδέλας της κρυσταλλικής δομής της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I[Δ(185-243)]. Οι αριθμοί των αμινοξικών καταλοίπων υποδεικνύουν τις χρωματικά κωδικοποιημένες περιοχές της apoA-I άγριου τύπου που παρουσίασαν διαφορές στην κινητικότητα μεγαλύτερες των 2 Å σε σχέση με τις τρεις μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I. **(Β)** Τιμές RMSF ανά κατάλοιπο των ατόμων του πεπτιδικού σκελετού που εξήχθησαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της apoA-I[Δ(185-243)] άγριου τύπου (συμβολίζονται με μπάρες) και των μεταλλαγμένων μορφών της (έγχρωμες συμπαγείς γραμμές).

Λόγω της μεγάλης ευελιξίας που παρουσίασε το μόριο της apoA-I[Δ(1-43)] άγριου τύπου δεν κατέστη δυνατό να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση των μεταλλάξεων στη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, γίνεται φανερό ότι και οι τρεις μεταλλάξεις προκαλούν αποσταθεροποίηση του καρβοξυτελικού άκρου της apoA-I[Δ(1-43)] (Σχήμα 4.19).



Σχήμα 4.19. Γραφική αναπαράσταση των τιμών RMSF ανά κατάλοιπο των ατόμων του πεπτιδικού σκελετού που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της

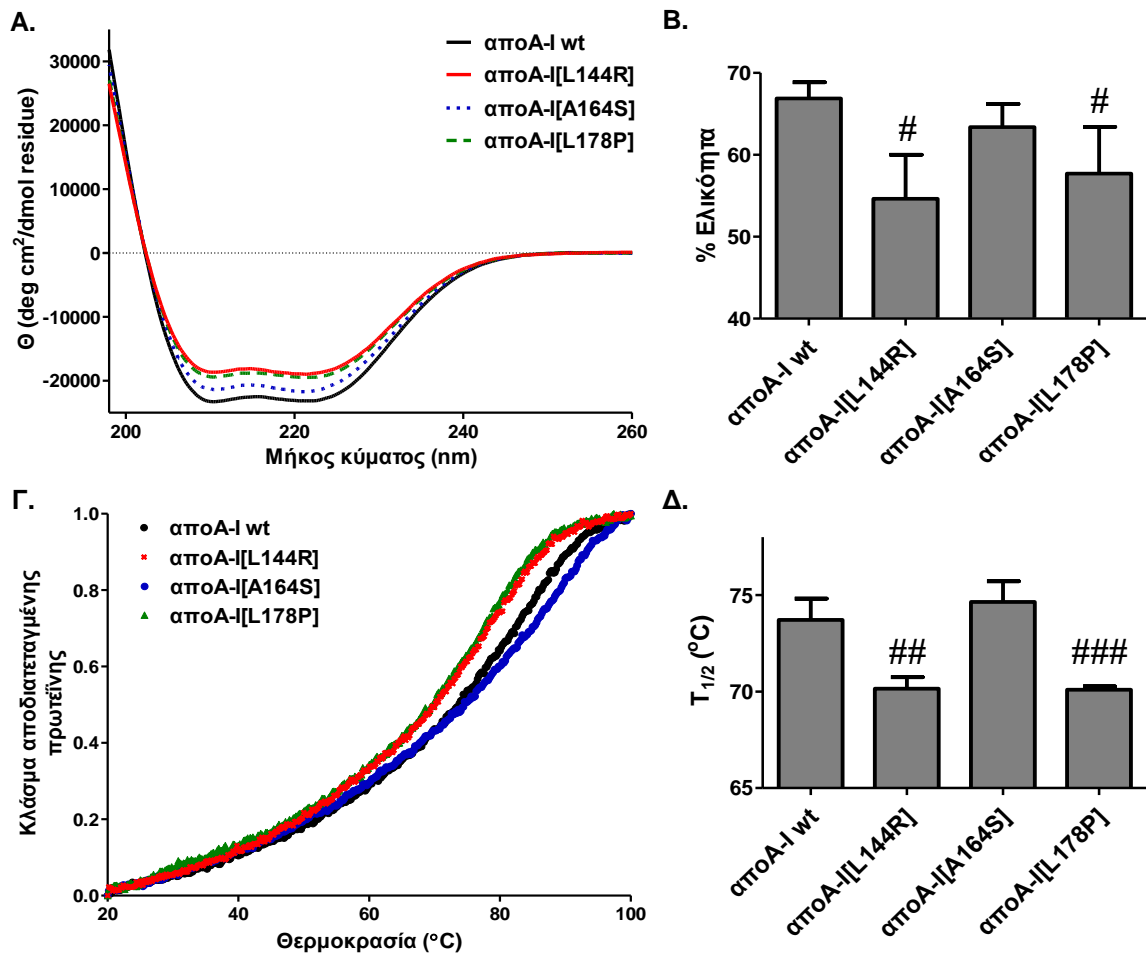
αποΑ-I[Δ(1-43)] άγριου τύπου (συμβολίζονται με μπάρες) και των μεταλλαγμένων μορφών της (έγχρωμες συμπαγείς γραμμές).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με τις δύο κρυσταλλογραφικές δομές της αποΑ-I και των αντίστοιχων μεταλλαγμένων μορφών τους υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P επηρεάζουν τη διαμορφωτική σταθερότητα του μορίου της αποΑ-I.

4.3.2.6 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής και της θερμοδυναμικής σταθερότητας των αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] ως συστατικών των δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL

Λόγω των δομικών και θερμοδυναμικών διαταραχών που επέφεραν οι μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P στο μόριο της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I, διερευνήθηκε περαιτέρω εάν οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα της αποΑ-I ως συστατικό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν rHDL σωματίδια, τα οποία περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου (rHDL-αποΑ-I wt) ή καθεμία από τις μεταλλαγμένες αποΑ-I (rHDL-αποΑ-I[L144R], rHDL-αποΑ-I[A164S], rHDL-αποΑ-I[L178P]), φωσφολιπίδια (POPC) και χοληστερόλη με αρχική μοριακή αναλογία 100:10:1 ως προς POPC: χοληστερόλη: αποΑ-I (βλ. παρ. 3.15.1).

Για να μελετηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη δευτεροταγή δομή και θερμοδυναμική σταθερότητα της αποΑ-I που περιέχεται σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, καταγράφηκαν τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) στο άπω υπεριώδες και τα προφίλ θερμικής αποδιάταξης (Σχήμα 4.20Α, Γ), αντίστοιχα, των rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή καθεμία από τις μεταλλαγμένες αποΑ-I.



Σχήμα 4.20. Βιοφυσική ανάλυση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου ή τις apoA-I[L144R], apoA-I[A164S], apoA-I[L178P]. (A). Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπλω υπεριώδες των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές της. Τα φάσματα προέκυψαν από τον μέσο όρο τεσσάρων ανεξαρτήτων πειραμάτων. **(B)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την εκατοστιαία ελικότητα των apoA-I άγριου τύπου, apoA-I[L144R], apoA-I[A164S] και apoA-I[L178P] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια. Το περιεχόμενο ποσοστό σε α-έλικα των apoA-I υπολογίστηκε με βάση τη μοριακή ελλειπτικότητα στα 222nm. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων. **(Γ)** Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των μορφών της apoA-I που περιέχονται σε rHDL σωματίδια. Τα προφίλ της θερμικής αποδιάταξης καθορίστηκαν, παρακολουθώντας τις αλλαγές της μοριακής ελλειπτικότητας στα 222nm με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 °C στους 100 °C. Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη κατάσταση. Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία. **(Δ)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη θερμοκρασία τήξης (T_{1/2}) στο μέσο της μετάβασης της καμπύλης θερμικής αποδιάταξης. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων. #p <0,05, ##p <0,005, ###p <0,0005 ως προς την apoA-I άγριου τύπου.

Από τις μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού διαπιστώθηκε πως οι μεταλλάξεις L144R και L178P παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά (p <0,05) μειωμένο

ποσοστό α-έλικας και διαταραγμένο προφίλ θερμικής αποδιάταξης, καθώς αποδιατάχθηκαν θερμικά σε μικρότερη θερμοκρασία ($T_{1/2}$), συγκρινόμενες με την αποΑ-I άγριου τύπου (Σχήμα 4.20B, Δ). Οι παρατηρούμενες μεταβολές υποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις L144R και L178P επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή και θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου της αποΑ-I, ακόμα και όταν περιέχονται σε rHDL σωματίδια. Αντιθέτως, η μετάλλαξη A164S δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στο ποσοστό α-έλικας και τη θερμοκρασία τήξης ($T_{1/2}$) στο μέσο της μετάβασης, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου. Παρόλο που η θερμοκρασία τήξης είναι ίδια, παρατηρήθηκε ότι η μετάλλαξη A164S επιφέρει μικρές μεν, αλλά επαναλαμβανόμενες αλλαγές στο προφίλ της θερμικής αποδιάταξης, υποδηλώνοντας μια διαφορετική διαμόρφωση για αυτή τη μετάλλαξη στα rHDL σωματίδια, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου.

4.3.3 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P]

Δεδομένων των διαταραχών που προκάλεσαν οι τρεις φυσικά απαντώμενες σημειακές μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P της αποΑ-I στη δομική πλαστικότητα και ακεραιότητα της πρωτεΐνης, τόσο στην ελεύθερη λιπιδίων, όσο και τη λιπιδιωμένη μορφή, διερευνήθηκε εάν οι διαταραχές αυτές συνοδεύονται και από διαταραχές των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της αποΑ-I/HDL, καθώς οι μεταλλάξεις αυτές έχουν σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ΚΑΝ ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η ικανότητα της αποΑ-I/HDL να επάγει εκροή κυτταρικής χοληστερόλης μέσω συγκεκριμένων μεμβρανικών μεταφορέων που συμμετέχουν στην πορεία βιογένεσης και αναδιοργάνωσης της HDL. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να προάγει μηχανισμούς επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου κατά την πρόκληση τραύματος, καθώς και η αντιοξειδωτική της δράση σε ενδοθηλιακά κύτταρα.

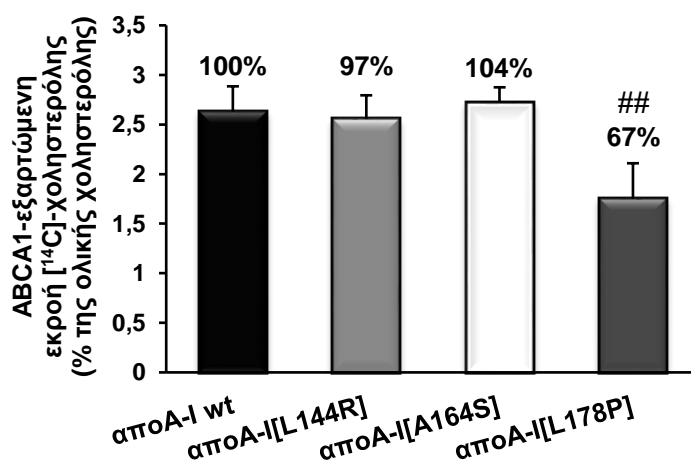
4.3.3.1 Μελέτη της ικανότητας των ελεύθερων λιπιδίων αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1

Κύριος αποδέκτης της χοληστερόλης που εξέρχεται από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 είναι η ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I και η ελάχιστα

λιπιδιωμένη αποΑ-I (προβ HDL). Οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τον μεταφορέα ABCA1 οδηγούν στον σχηματισμό της πρόδρομης HDL^[113,418]. Έχει δειχθεί ότι μεταλλάξεις στο μόριο της αποΑ-I μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητά της να προάγει εκροή κυτταρικής χοληστερόλης ή/και να αλληλεπιδρά με τον μεταφορέα ABCA1^[121,123,124].

Η ικανότητα των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 μελετήθηκε, σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου, στην κυτταρική σειρά μακροφάγων μυός J774. Τα κύτταρα J774 επωάστηκαν για 24 h, παρουσία ή απουσία του αναλόγου του cAMP, crt-cAMP, το οποίο επάγει την έκφραση του ABCA1 και ακολούθως επωάστηκαν για 4 h, παρουσία ή απουσία 1μM ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I, μεταλλαγμένης ή μη. Η καθαρή (net) ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε αφαιρώντας την τιμή της μη ειδικής εκροής χοληστερόλης που προσδιορίστηκε από τα κύτταρα J774 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επωάστηκαν με το crt-cAMP.

Η τιμή της ABCA1-εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης που αντιστοιχεί στην αποΑ-I άγριου τύπου ορίστηκε ως 100%. Συγκρινόμενη με την αποΑ-I άγριου τύπου, η επαγόμενη από τον ABCA1 εκροή χοληστερόλης παρουσία των αποΑ-I[L144R] και αποΑ-I[A164S] ήταν 97% και 104%, αντίστοιχα, ενώ παρουσία της αποΑ-I[L178P] ήταν 67% (Σχήμα 4.21).



Σχήμα 4.21. ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία 1 μM αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] ή αποΑ-I[L178P]. Τα μακροφάγα J774 επισημάνθηκαν με [¹⁴C]-χοληστερόλη, για 24 h και ακολούθως επωάστηκαν απουσία ή παρουσία 0,3 mM crt-cAMP. Μετά το πέρας της επώασης με το crt-cAMP, τα κύτταρα επωάστηκαν απουσία ή παρουσία 1 μM αποΑ-I άγριου τύπου ή μεταλλαγμένων αποΑ-I, για 4 h. Η ABCA1-

εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε, αφαιρώντας τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία δεν επώαστηκαν με το crt-cAMP από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επώαστηκαν με crt-cAMP. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις τριπλούν. Τα ποσοστά αναφέρονται σε σχέση με την ικανότητα της αποA-I άγριου τύπου, που ορίζεται ως 100%. ##p <0,005 ως προς την αποA-I άγριου τύπου.

Συμπερασματικά, η ικανότητα των αποA-I[L144R] και αποA-I[A164S] να επάγουν εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 ήταν αντίστοιχη με την ικανότητα της αποA-I άγριου τύπου. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με το γεγονός ότι η μετάλλαξη L144R έχει σχετιστεί με χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης (HDL-C), αλλά αυτό έχει αποδοθεί σε μειωμένη ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT^[176,419], που επηρεάζει μεταγενέστερο βήμα της πορείας βιογένεσης της HDL, ενώ η μετάλλαξη A164S δεν έχει σχετιστεί με χαμηλά επίπεδα HDL-C^[177]. Αντιθέτως, η επαγόμενη από τον ABCA1 εκροή χοληστερόλης παρουσία της αποA-I[L178P] ήταν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,005$) μειωμένη, συγκρινόμενη με την αποA-I άγριου τύπου. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως η μετάλλαξη L178P επηρεάζει το πρώτο βήμα της πορείας βιογένεσης της HDL και πιθανόν αυτό να εξηγεί τα μειωμένα επίπεδα HDL-C που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες τη μετάλλαξη^[178].

4.3.3.2 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στην ικανότητα της λιπιδιωμένης αποA-I να επάγει εκροή χοληστερόλης και 7-κετοχοληστερόλης μέσω του υποδοχέα της HDL SR-BI ή μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1

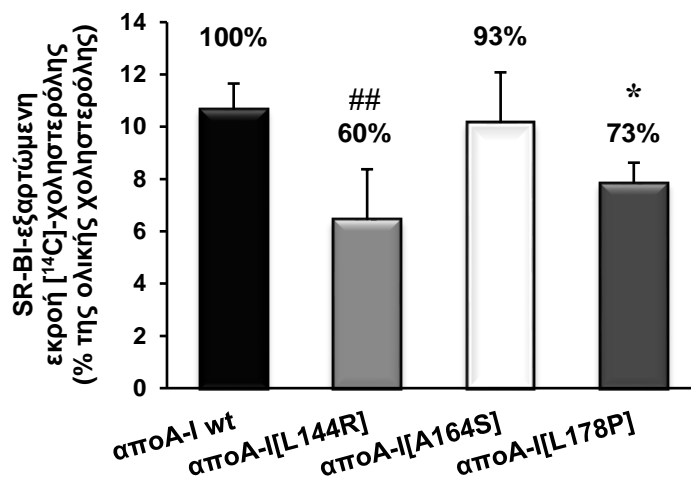
Είναι γνωστό ότι οι διαταραχές της ομοιόστασης των λιπιδίων, καθώς και του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών συμβάλλουν στον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μη φυσιολογικών ποσοτήτων χοληστερόλης και αφρωδών κυττάρων (διογκωμένα μακροφάγα) στο τοίχωμα^[180,420]. Οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποA-I/HDL έχουν εν μέρει αποδοθεί στην ικανότητά της να επάγει την πορεία ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης, η οποία οδηγεί στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα αφρώδη μακροφάγα των αγγείων^[195].

Η HDL, μετά τον σχηματισμό της, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1, προάγοντας την εκροή κυτταρικής χοληστερόλης από τα μακροφάγα^[16,421]. Επιπρόσθετα, η ώριμη HDL μπορεί να αλληλεπιδράσει

με τον υποδοχέα της SR-BI, ο οποίος διευκολύνει την αμφίδρομη ροή της ελεύθερης χοληστερόλης μεταξύ των κυττάρων και της HDL. Ακολούθως, η περίσσεια χοληστερόλης απομακρύνεται μέσω των αλληλεπιδράσεων της HDL με τον ηπατικό SR-BI, που επάγει την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης^[7,167]. Τελικά, η χοληστερόλη απεκκρίνεται από το ήπαρ προς τη χολή είτε άμεσα, είτε μετά τη μετατροπή της σε χολικά οξέα^[195,422].

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στην ικανότητα της αποA-I, ως συστατικό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του υποδοχέα της HDL, SR-BI ή μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1, καθώς οι μεταλλάξεις αυτές έχουν σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C. Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν rHDL σωματίδια, τα οποία περιείχαν την αποA-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.15.1.

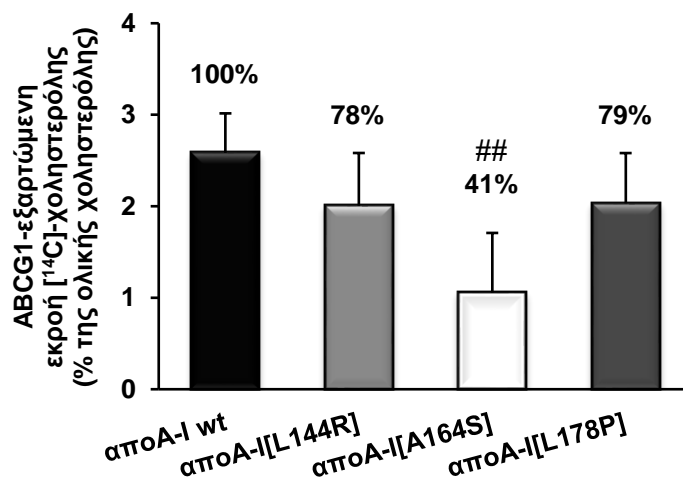
Κύτταρα HEK293 επιμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pcDNA 3.1-SR-BI ή pcDNA 3.1-ABCG1 που φέρουν το cDNA της αλληλουχίας του ανθρώπινου SR-BI ή του ανθρώπινου ABCG1, αντίστοιχα ή με τον φορέα έκφρασης pcDNA 3.1 απουσία ενθέματος (mock), επισημάνθηκαν με [¹⁴C]-χοληστερόλη και επωάστηκαν παρουσία ή απουσία 1μM, ως προς την αποA-I, rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποA-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.22.2. Η καθαρή (net) SR-BI-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε, αφαιρώντας την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του SR-BI. Κατά τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκε η καθαρή (net) ABCG1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης. Στα σχήματα 4.22 και 4.23 παρουσιάζονται αντίστοιχα, η SR-BI- και η ABCG1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, σε αντιπαράβολή με την αποA-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια.



Σχήμα 4.22. SR-BI-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν τις αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P]. Κύτταρα HEK293 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 ή με το πλασμίδιο έκφρασης του SR-BI, επισημάνθηκαν με [¹⁴C]-χοληστερόλη για 20 h και επώαστηκαν για 4 h, παρουσία ή απουσία 1 μM rHDL σωματιδίων, ως προς την αποΑ-I, που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες αποΑ-I. Η SR-BI-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε, αφαιρώντας την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του SR-BI. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Οι αριθμοί στην κορυφή των στηλών αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά της εξαρτωμένης από τον SR-BI εκροής χοληστερόλης και αναφέρονται σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια, της οποίας το ποσοστό ορίζεται ως 100%. *p < 0,01, ##p < 0,005 ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

Η τιμή του ποσοστού της επαγόμενης από τους SR-BI και ABCG1 εκροής χοληστερόλης παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ορίστηκε ως 100% (Σχήματα 4.22 και 4.23), ώστε να διευκολυνθεί η σύγκριση μεταξύ των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I και της αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχονται σε rHDL σωματίδια. Όπως προκύπτει από την ανάλυση, οι μεταλλάξεις L144R και L178P μείωσαν στατιστικώς σημαντικά (p < 0,01, p < 0,005, αντίστοιχα) την ικανότητα της αποΑ-I που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του SR-BI από κύτταρα HEK293, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου. Ενώ, παρουσίασαν παρόμοια ικανότητα με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του ABCG1. Αντιθέτως, η αποΑ-I[A164S], που περιέχεται σε rHDL σωματίδια, παρουσίασε αντίστοιχη ικανότητα με την αποΑ-I άγριου τύπου να

επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του SR-BI, αλλά μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,005$) την επαγόμενη από τον ABCG1 εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK293, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια.



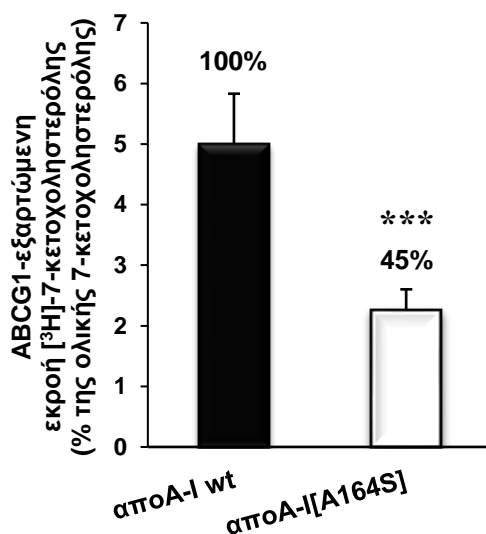
Σχήμα 4.23. ABCG1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν τις αποΑ-I άγριου τύπου, αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P]. Κύτταρα HEK293 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1, επισημάνθηκαν με [¹⁴C]-χοληστερόλη για 20 h και επώαστηκαν για 4 h, παρουσία ή απουσία 1 μM rHDL σωματιδίων, ως προς την αποΑ-I, που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες αποΑ-I. Η ABCG1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε, αφαιρώντας την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Οι αριθμοί στην κορυφή των στηλών αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά της εξαρτωμένης από τον ABCG1 εκροής χοληστερόλης και αναφέρονται σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια, της οποίας το ποσοστό ορίζεται ως 100%. ^{##} $p < 0,005$ ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

Συμπερασματικά, οι σημειακές μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P επηρεάζουν την ικανότητα της αποΑ-I που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του υποδοχέα της HDL, SR-BI, ή μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι οι τρεις μεταλλάξεις πιθανόν διαταράσσουν τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL που περιέχει τις μεταλλαγμένες αποΑ-I.

Εκτός της εκροής κυτταρικής χοληστερόλης, ο ABCG1 έχει δειχθεί ότι προάγει την εκροή οξυστερολών από μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα προς

την HDL, προστατεύοντας κατά αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα από δυσλειτουργία και απόπτωση^[159,211]. Μεταξύ των οξυστερολών που έχουν αναγνωρισθεί, εκείνες που είναι οξειδωμένες στη θέση C7, όπως η 7-κετοχοληστερόλη, έχουν ανιχνευθεί σε υψηλά επίπεδα στις ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες και την οξειδωμένη LDL^[156]. Προκειμένου, λοιπόν, να διερευνηθεί εάν η αποA-I[A164S] επηρεάζει την εκροή χοληστερόλης και 7-οξυστερολών με παρόμοιο τρόπο, πραγματοποιήθηκε μελέτη της εκροής της 7-κετοχοληστερόλης σε κύτταρα HEK293.

Ειδικότερα, κύτταρα HEK293 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 ή το πλασμίδιο pcDNA3.1, επισημάνθηκαν με [³H]-7-κετοχοληστερόλη και επωάστηκαν παρουσία ή απουσία 1μM, ως προς την αποA-I, rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποA-I άγριου τύπου ή την αποA-I[A164S]. Η επαγόμενη από τον ABCG1 εκροή 7-κετοχοληστερόλης υπολογίστηκε, αφαιρώντας την τιμή της εκροής 7-κετοχοληστερόλης των κυττάρων HEK293 που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 (Σχήμα 4.24).



Σχήμα 4.24. ABCG1-εξαρτώμενη εκροή 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I άγριου τύπου ή την αποA-I[A164S]. Κύτταρα HEK293 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 ή με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1, επισημάνθηκαν με [³H]-7-κετοχοληστερόλη για 20 h και επωάστηκαν για 4 h, παρουσία ή απουσία 1 μM rHDL σωματιδίων, ως προς την αποA-I, που περιέχουν την αποA-I άγριου τύπου ή την αποA-I[A164S]. Η ABCG1-εξαρτώμενη εκροή 7-κετοχοληστερόλης υπολογίστηκε, αφαιρώντας την τιμή της εκροής 7-κετοχοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής 7-κετοχοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Οι αριθμοί στην κορυφή των

στηλών αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά της ABCG1-εξαρτωμένης εκροής 7-κετοχοληστερόλης και αναφέρονται σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια, της οποίας το ποσοστό ορίζεται ως 100%. *** $p < 0,0001$ ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

Η τιμή του ποσοστού της επαγόμενης εκροής 7-κετοχοληστερόλης από τον ABCG1 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου τέθηκε ως 100%. Η ανάλυση έδειξε ότι η μετάλλαξη A164S μειώνει στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,0001$) την ικανότητα της αποΑ-I που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγει την εκροή 7-κετοχοληστερόλης μέσω του ABCG1, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου.

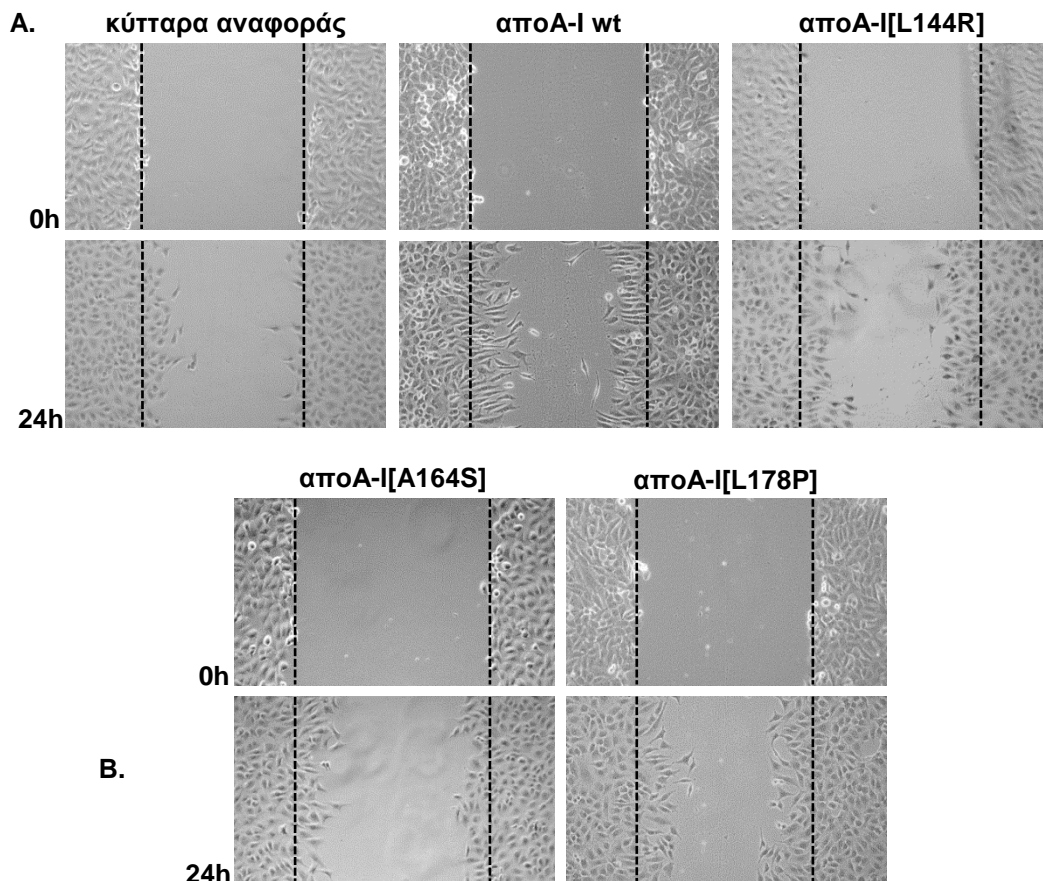
Συνολικά, διαπιστώθηκε πως η αποΑ-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια μειώνει κατά αντίστοιχο τρόπο την εκροή χοληστερόλης και 7-κετοχοληστερόλης από κύτταρα HEK293, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1.

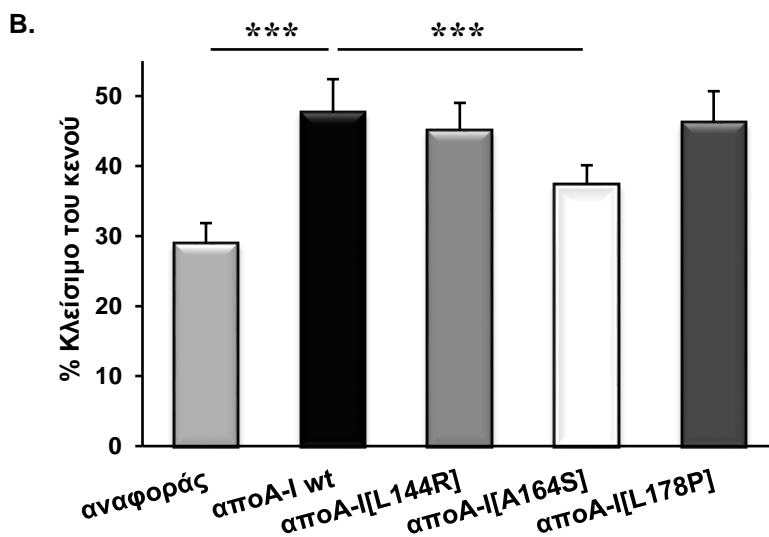
4.3.3.3 Μελέτη της επίδρασης των σημειακών μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στην ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να επάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων

Το ενδοθήλιο, η κυτταρική στιβάδα που καλύπτει τον αυλό των αιμοφόρων αγγείων, διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην αγγειακή ομοίωση, ρυθμίζοντας τον αγγειακό τόνο, την αιμόσταση και την αγγειογένεση^[204,423]. Οι μεταβολές στις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης διαθεσιμότητας ενδοθηλιακού NO, καθώς και η διατάραξη της ακεραιότητας του ενδοθηλίου αποτελούν χαρακτηριστικό των πρώτων σταδίων ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης^[424]. Έχειδειχθεί ότι η HDL, εκτός της ικανότητάς της να επάγει την απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα, ασκεί μια σειρά αντιαθηρογόνων επιδράσεων στο ενδοθήλιο, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ακεραιότητάς του^[362]. Ειδικότερα, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η HDL διεγείρει την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προάγει μηχανισμούς επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου του έσω χιτώνα *in vivo*, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων^[206,215]. Επιπρόσθετα, οι μελέτες αυτές προτείνουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ως έναν μηχανισμό μέσω του οποίου η HDL εμποδίζει την έναρξη της αθηροσκλήρωσης^[215,425].

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P της αποΑ-I στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων μελετήθηκε η

ικανότητα των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες αποΑ-I να επάγουν τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων. Για τη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε η *in vitro* δοκιμασία προσομοίωσης επούλωσης πληγών (wound healing assay) στη σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν μετά την πρόκληση τεχνητής πληγής, για 24 h, απουσία ή παρουσία 100 µg/mL rHDL σωματιδίων, ως προς την αποΑ-I, που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες αποΑ-I, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.1. Στο σχήμα 4.25A παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας πριν (T_{0h}) και μετά (T_{24h}) την επώαση των κυττάρων EA.hy926 με τα rHDL σωματίδια. Η επίδραση των rHDL σωματιδίων στην κυτταρική μετανάστευση εκφράστηκε ως το % ποσοστό της επιφάνειας του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} (Σχήμα 4.25B).



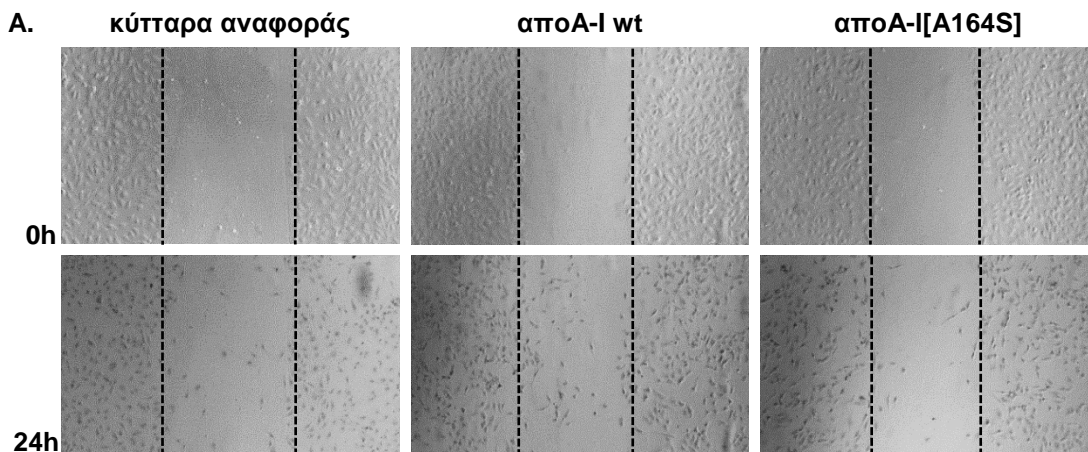


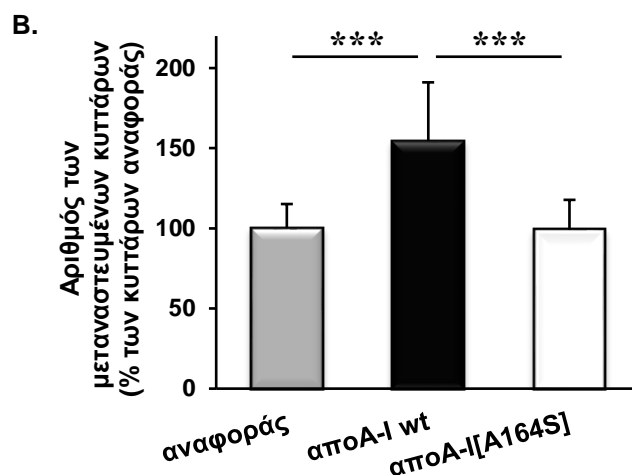
Σχήμα 4.25. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες apoA-I, apoA-I[L144R], apoA-I[A164S] ή apoA-I[L178P], στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Στη μονοστιβάδα της καλλιέργειας των κυττάρων EA.hy926 προκλήθηκε τεχνητή πληγή με τη χρήση ακροσυγχίου (200 μ L) αυτόματης πιπέττας και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h, με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, παρουσία ή απουσία 100 μ g/mL rHDL σωματιδίων (ως προς την apoA-I) που περιείχαν την apoA-I άγριου τύπου ή τις μεταλλαγμένες apoA-I. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα EA.hy926 φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (αντικειμενικός φακός 10x) αμέσως μόλις έγινε η χορήγηση των rHDL σωματιδίων (T_{0h}) και μετά το πέρας της 24ωρης επώασης (T_{24h}). Από τις φωτογραφίες του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε η επιφάνεια του κενού σε χρόνο T_{0h} και T_{24h} , με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Image J. **(A)** Ενδεικτικές φωτογραφίες των κυττάρων EA.hy926 πριν (T_{0h}) και μετά την επώαση (T_{24h}) παρουσία ή απουσία των rHDL σωματιδίων. **(B)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει το % ποσοστό της επιφάνειας του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} . Η επιφάνεια του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} υπολογίστηκε, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.1. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τεσσάρων τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων. *** $p < 0,0001$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς και ως προς την apoA-I άγριου τύπου.

Σε συμφωνία με ερευνητικές μελέτες^[215], διαπιστώθηκε ότι τα rHDL σωματίδια που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου είναι ικανά να επάγουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,0001$) της μετανάστευσης των EA.hy926 εντός της τεχνητής πληγής, σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με θρεπτικό μέσο (κύτταρα αναφοράς). Από την ανάλυση προέκυψε ότι οι μεταλλαγμένες apoA-I, apoA-I[L144R] και apoA-I[L178P], που περιέχονται σε rHDL σωματίδια εμφάνισαν αντίστοιχη ικανότητα με την apoA-I άγριου τύπου να επάγουν την κυτταρική

μετανάστευση. Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με rHDL σωματίδια που περιείχαν την αποΑ-I[A164S] επέδειξαν μειωμένη μετανάστευση ($p < 0,0001$, επιφάνεια του κενού που κάλυψαν σε χρόνο T_{24h} : $37,4 \pm 2,7$), σε σχέση με τα κύτταρα που επωάστηκαν με rHDL σωματίδια που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου (επιφάνεια του κενού που κάλυψαν σε χρόνο T_{24h} : $47,6 \pm 4,8$).

Για να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της μετάλλαξης A164S στην ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να επάγει την κυτταρική μετανάστευση, πραγματοποιήθηκε εκ νέου η *in vitro* δοκιμασία προσομοίωσης επούλωσης πληγών σε πρωτογενή καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων στεφανιαίας αρτηρίας, HCAEC, ένα μοντέλο που προσομοιάζει περισσότερο στις φυσιολογικές συνθήκες. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι όμοια με την προαναφερθείσα. Για κάθε συνθήκη, προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων που είχαν μεταναστεύσει εντός της τεχνητής πληγής σε χρόνο T_{24h} , όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.1 και η επίδραση των rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των κυττάρων HCAEC εκφράστηκε ως το εκατοστιαίο ποσοστό του αριθμού των κυττάρων αναφοράς (Σχήμα 4.26B).





Σχήμα 4.26. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-Ι άγριου τύπου ή την αποΑ-Ι[A164S] στη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων στεφανιαίας αρτηρίας, HCAEC. Στη μονοστιβάδα της πρωτογενούς καλλιέργειας κυττάρων HCAEC προκλήθηκε τεχνητή πληγή, με τη χρήση ακρορυγχίου (200 μ L) αυτόματης πιπέττας και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h, με θρεπτικό μέσο, παρουσία ή απουσία 100 μ g/mL rHDL σωματιδίων (ως προς την αποΑ-Ι) που περιείχαν την αποΑ-Ι άγριου τύπου ή την αποΑ-Ι[A164S]. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα HCAEC φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (αντικειμενικός φακός 5x) αμέσως μόλις έγινε η χορήγηση των rHDL σωματιδίων (T_{0h}) και μετά το πέρας της 24ωρης επώασης (T_{24h}). Από τις φωτογραφίες του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων που είχαν μεταναστεύσει εντός του κενού σε χρόνο T_{24h} , με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Image J. **(Α)** Ενδεικτικές φωτογραφίες των κυττάρων HCAEC πριν (T_{0h}) και μετά την επώαση (T_{24h}) παρουσία ή απουσία των rHDL σωματιδίων. **(Β)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει το % ποσοστό του αριθμού των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει εντός της επιφάνειας του κενού σε χρόνο T_{24h} . Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση δύο ανεξαρτήτων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. *** $p < 0,0001$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς και ως προς την αποΑ-Ι άγριου τύπου.

Από την ανάλυση προέκυψε πως τα rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-Ι άγριου τύπου αύξησαν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,0001$) τον αριθμό των κυττάρων HCAEC που μετανάστευσαν εντός της τεχνητής πληγής, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (απουσία rHDL σωματιδίων). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($p < 0,0001$) της μετανάστευσης των κυττάρων HCAEC όταν επώαστηκαν με τα rHDL σωματίδια που περιείχαν την αποΑ-Ι[A164S], σε σχέση με την αποΑ-Ι άγριου τύπου.

Συμπερασματικά, η μετάλλαξη A164S μειώνει την ικανότητα της αποΑ-Ι που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να προάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων

ενδοθηλιακών κυττάρων, τόσο σε αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά (EA.hy926), όσο και σε πρωτογενή καλλιέργεια (HCAEC).

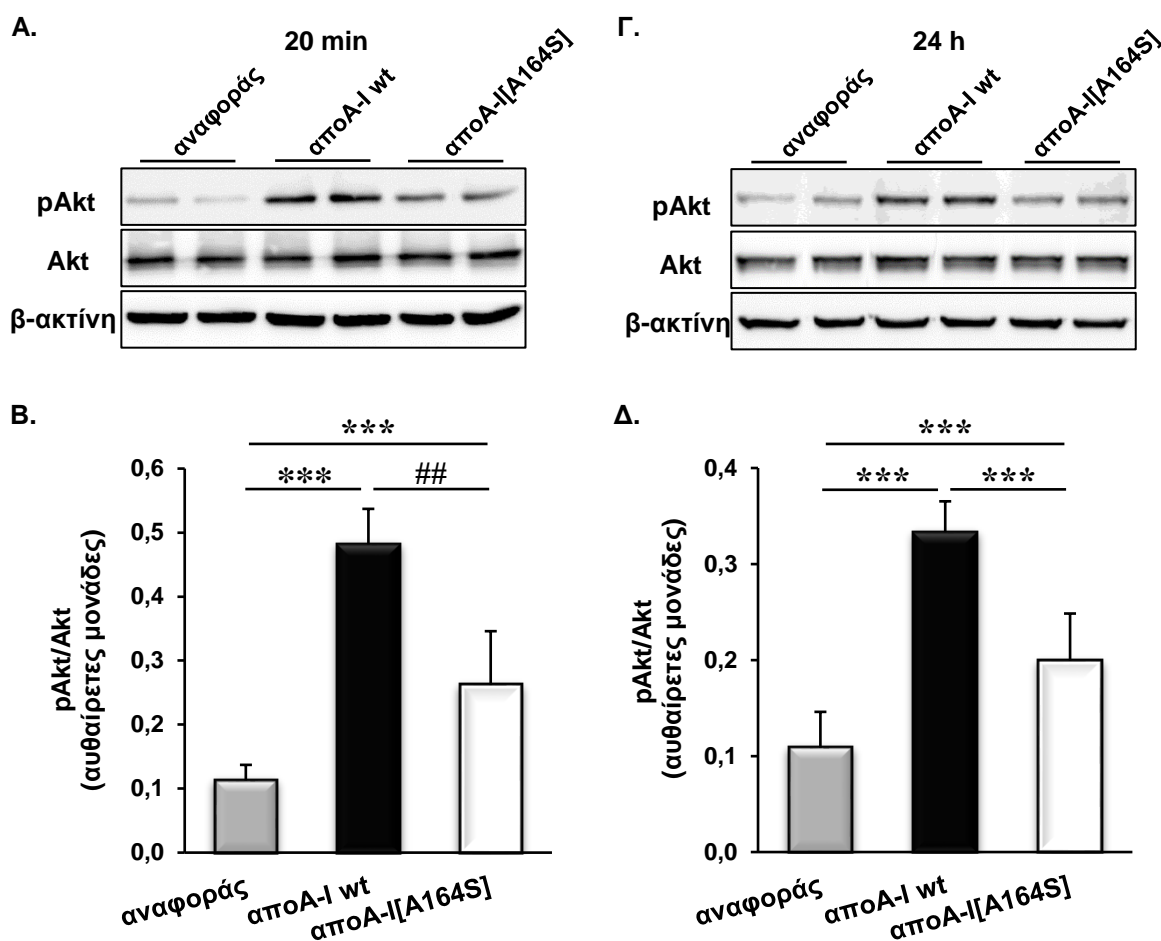
4.3.3.4 Διερεύνηση της επίδρασης δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] στη μοριακή οδό σηματοδότησης της μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926

Είναι γνωστό ότι η HDL επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω αλληλεπιδράσεων με τον υποδοχέα της SR-BI ή μέσω των υποδοχέων της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης (S1PRs)^[205,426]. Αρκετές ερευνητικές μελέτες προτείνουν πως η πρόσδεση της HDL στον ενδοθηλιακό SR-BI ενεργοποιεί τη διαδοχική οδό σηματοδότησης των κινασών Src/PI3K/Akt, που καταλήγει καθοδικά στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Rac GTPases, οι οποίες επάγουν τον σχηματισμό ελασματοποδίων, διεγείροντας τελικά τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων^[198]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα rHDL σωματίδια που περιέχουν φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και αποΑ-I είναι ικανά να επάγουν τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων αρτηής βοοειδών (bovine aorta endothelial cells, BAEC) *in vitro*, μέσω της παραπάνω μοριακής οδού^[215].

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η φυσικά απαντώμενη μετάλλαξη της αποΑ-I, A164S, επηρεάζει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω της μοριακής οδού σηματοδότησης που αναφέρεται παραπάνω, αξιολογήθηκε η ενεργοποίηση της κινάσης Akt κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επωάστηκαν απουσία ή παρουσία 100 μg/mL, ως προς την αποΑ-I, rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S], για 20 min και 24 h, αντίστοιχα. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt σε κατάλοιπα σερίνης (pAkt-Ser473) προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση western στα κυτταρικά λύματα. Τα ανοσοαποτυπώματα western των υπό εξέταση πρωτεϊνών (Σχήμα 4.27A, Γ) ποσοτικοποιήθηκαν πυκνομετρικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J.

Η αξιολόγηση της ενεργοποίησης της κινάσης Akt πραγματοποιήθηκε ύστερα από κανονικοποίηση των επιπέδων της pAkt έναντι των ολικών επιπέδων της Akt (Σχήμα 4.27B, Δ). Αξίζει να αναφερθεί ότι η έκφραση της Akt, στους δύο χρόνους που μελετήθηκαν, δε μεταβάλλεται μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών

επώασης των κυττάρων, όπως προκύπτει από τον προσδιορισμό της έκφρασης της ως προς τη β-ακτίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας.

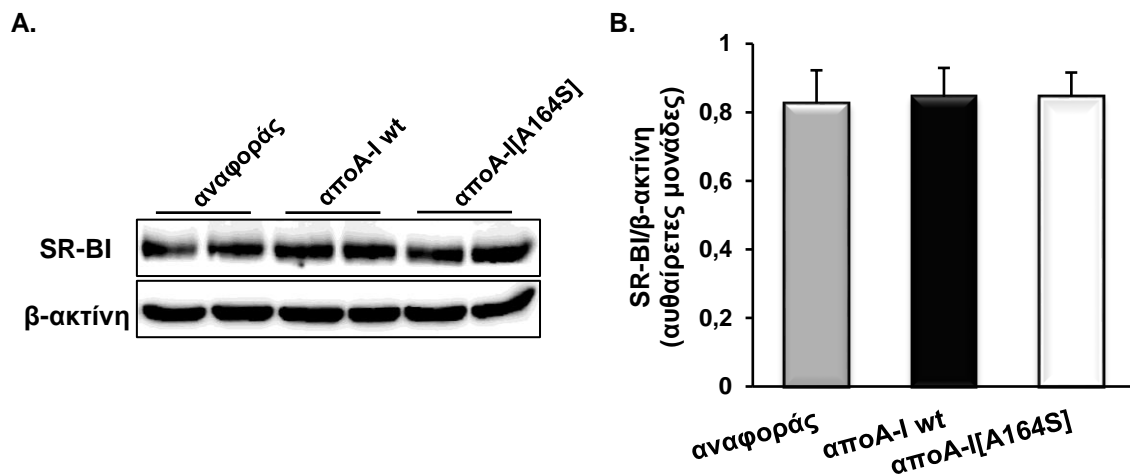


Σχήμα 4.27. Επίδραση των apoA-I άγριου τύπου και apoA-I[A164S] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, απουσία ή παρουσία 100 μg/mL (ως προς την apoA-I) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την apoA-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη apoA-I, για 20 min και 24 h, αντίστοιχα. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα λύθηκαν, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.2.2. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης από τα λύματα των κυττάρων αναλύθηκε σε πηκτή 12% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση western με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης Akt στη σερίνη 473 (pAkt-Ser473), της ολικής Akt και της β-ακτίνης. Τα ανοσοαποτυπώματα ποσοτικοποιήθηκαν πυκνομετρικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J. Τα επίπεδα της pAkt-Ser473 στα δείγματα της ίδιας πηκτής κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ολικής Akt. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας (housekeeping gene). (A, Γ) Ενδεικτικά ανοσοαποτυπώματα western για τις πρωτεΐνες pAkt, Akt και β-ακτίνη στα 20 min (A) και στις 24 h (Γ). (B, Δ) Ραβδογράμματα που αναπαριστούν τον λόγο pAkt/Akt στα 20 min (B) και στις 24 h (Δ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση που προέκυψαν από την πυκνομετρική ανάλυση τεσσάρων τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις

διπλούν ή εις τριπλούν. ##p <0,005 ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου, ***p <0,0001 ως προς τα κύτταρα αναφοράς και ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

Από τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt στη σερίνη 473 διαπιστώθηκε πως η επώαση των κυττάρων EA.hy926 τόσο στα 20 min, όσο και στις 24 h, παρουσία των rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] οδήγησε σε ενεργοποίηση της κινάσης Akt, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς. Παρατηρήθηκε, όμως, ότι τα κύτταρα EA.hy926 που επωάστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I[A164S] μείωσαν στατιστικώς σημαντικά τόσο στα 20 min, όσο και στις 24 h (p <0,005 και p <0,0001, αντίστοιχα) τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt στη σερίνη 473, σε σχέση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt των κυττάρων που επωάστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου. Η μειωμένη ενεργοποίηση της κινάσης Akt πιθανόν να εξηγεί τη μειωμένη ικανότητα της αποΑ-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926, HCAEC), καθώς η Akt ενεργοποιείται καθοδικά της μοριακής οδού σηματοδότησης που επάγεται από την πρόσδεση της HDL στον ενδοθηλιακό SR-BI και η οποία διεγείρει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Για να διαλευκανθεί εάν οι διαφορές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt οφείλονται σε αλλαγή της έκφρασης του υποδοχέα της HDL, SR-BI, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του SR-BI σε κύτταρα EA.hy926, κατόπιν επώασης αυτών για 24 h, απουσία ή παρουσία 100 μg/mL, ως προς την αποΑ-I, rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]. Έχει δειχθεί βιβλιογραφικά ότι η οξειδωμένη HDL, καθώς και η HDL ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της HDL, SR-BI, σε ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVEC)^[427]. Στο σχήμα 4.28B παρουσιάζεται η πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών της υπό εξέταση πρωτεΐνης που προέκυψε από την ανοσοαποτύπωση western με αντίσωμα έναντι του SR-BI (Σχήμα 4.28A).



Σχήμα 4.28. Επίδραση των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[A164S] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της HDL SR-BI σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, απουσία ή παρουσία 100 μg/mL (ως προς την αποΑ-I) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποΑ-I, για 24 h. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης από τα λύματα των κυττάρων αναλύθηκε σε πηκτή 10% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του SR-BI και της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Τα ανοσοαποτυπώματα (A) ποσοτικοποιήθηκαν πυκνομετρικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J. Τα επίπεδα του SR-BI στα δείγματα της ίδιας πηκτής κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης (B). Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση που προέκυψαν από την πυκνομετρική ανάλυση δύο ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις τριπλούν.

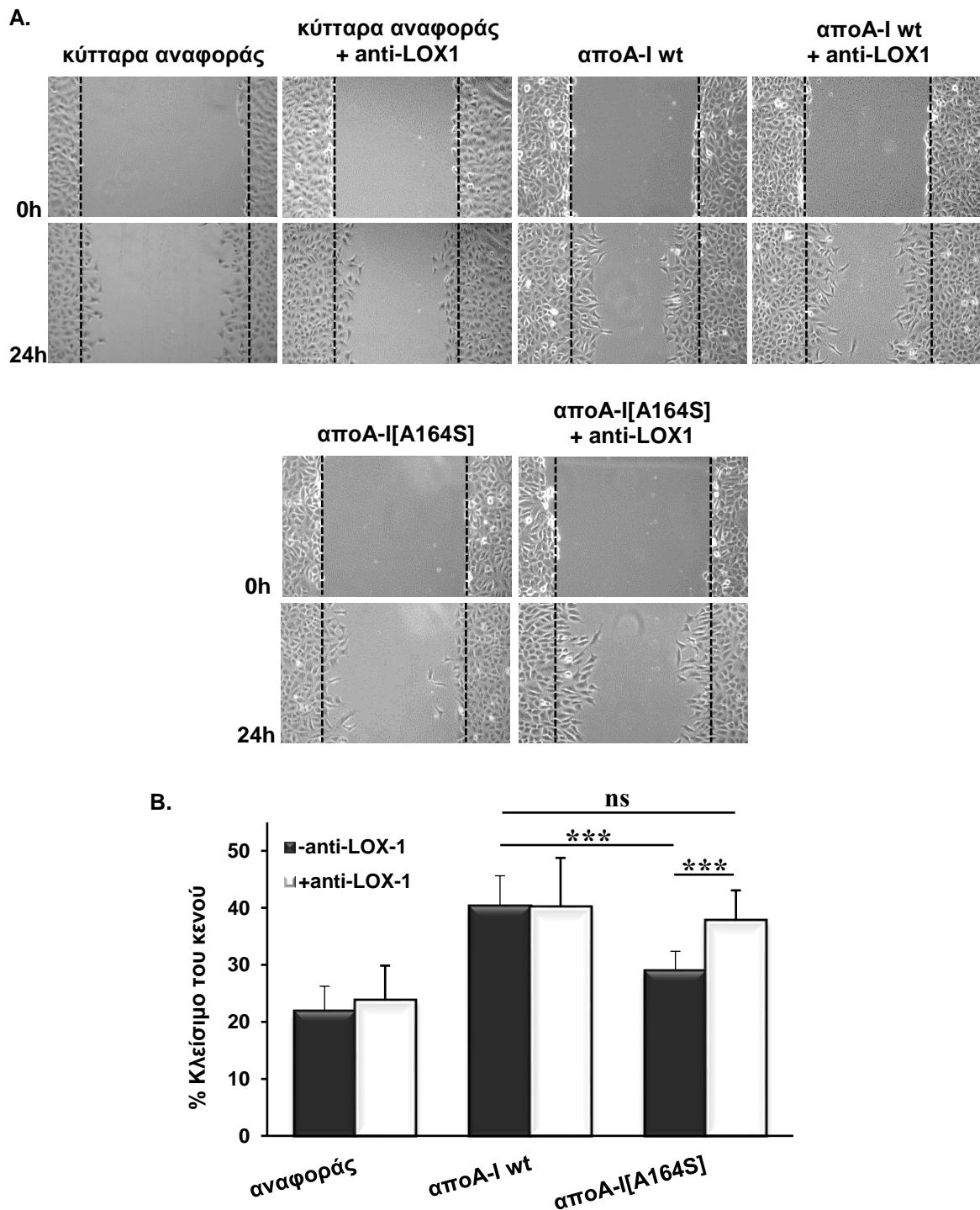
Όπως προκύπτει από την ανάλυση, η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S] δεν οδήγησε σε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα της HDL, SR-BI, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Εφόσον διαπιστώθηκε πως η μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Akt δεν οφείλεται σε αλλαγές της έκφρασης του υποδοχέα της HDL, SR-BI, διερευνήθηκε περαιτέρω μέσω ποιοι πιθανού μοριακού μηχανισμού η μετάλλαξη A164S οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση της κινάσης Akt και πιθανόν στη μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων.

4.3.3.5 Διερεύνηση της επίδρασης του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 παρουσία δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]

Είναι ευρέως γνωστό ότι η HDL εμφανίζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, περιορίζοντας την οξείδωση των LDL ή ανάγοντας τα ήδη οξειδωμένα λιπίδια, προστατεύοντας κατά αυτόν τον τρόπο τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα^[196]. Η αντιοξειδωτική δράση της HDL οφείλεται κυρίως στην αποΑ-I, η οποία, όπως έχειδειχθεί τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, είναι ικανή να δεσμεύει και να απομακρύνει από την κυκλοφορία τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων^[428]. Επιπρόσθετα, η HDL φέρει στο μόριο της διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα οποία πιθανόν εμπλέκονται στην αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων ή στην αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, μεταξύ των οποίων είναι η PON1, η PAF-AH και η LCAT^[220,429].

Παρόλα αυτά, όπως έχει ήδη αναφερθεί ανωτέρω, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η χρόνια φλεγμονή, η στεφανιαία νόσος και ο διαβήτης, η αποΑ-I/HDL υπόκειται οξειδωτικές τροποποιήσεις, οι οποίες μεταβάλλουν αμφότερα τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες και τη σύστασή της με αποτέλεσμα να καθίσταται δυσλειτουργική και συχνά προαθηρογόνος^[427,430]. Έχει δειχθεί ότι η HDL ασθενών με διαφορετικά νοσήματα δεν κατάφερε να επάγει την ενδοθηλιακή ακεραιότητα, ούτε να διεγείρει την παραγωγή NO από την ενδοθηλιακή συνθάση NO (eNOS)^[198]. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η HDL ασθενών με στεφανιαία νόσο ή οξύ στεφανιαίο σύνδρομο οδηγεί στην ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού υποδοχέα οξειδωμένων λιπιδίων LOX-1, ο οποίος αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt στη σερίνη 473^[206].

Συνδυάζοντας, λοιπόν, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, αλλά και τη βιβλιογραφία επαναλήφθηκε η *in vitro* δοκιμασία προσομοίωσης επούλωσης πληγών στη σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 για τις αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[A164S] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια, απουσία ή παρουσία 15 μg/mL ειδικού αντισώματος έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 (anti-LOX-1). Στο σχήμα 4.29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης.



Σχήμα 4.29. Επίδραση της αναστολής του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I άγριου τύπου ή την αποA-I[A164S]. Στη μονοστιβάδα της καλλιέργειας των κυττάρων EA.hy926 προκλήθηκε τεχνητή πληγή με τη χρήση ακρορυγχίου (200 μ L) αυτόματης πιπέτας και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h, με θρεπτικό μέσο άνευ ορού ή με 100 μ g/mL (ως προς την αποA-I) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποA-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποA-I, απουσία ή παρουσία 15 μ g/mL ειδικού αντισώματος έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 (anti-LOX-1). Για την αξιολόγηση της επίδρασης της αναστολής του υποδοχέα LOX-1

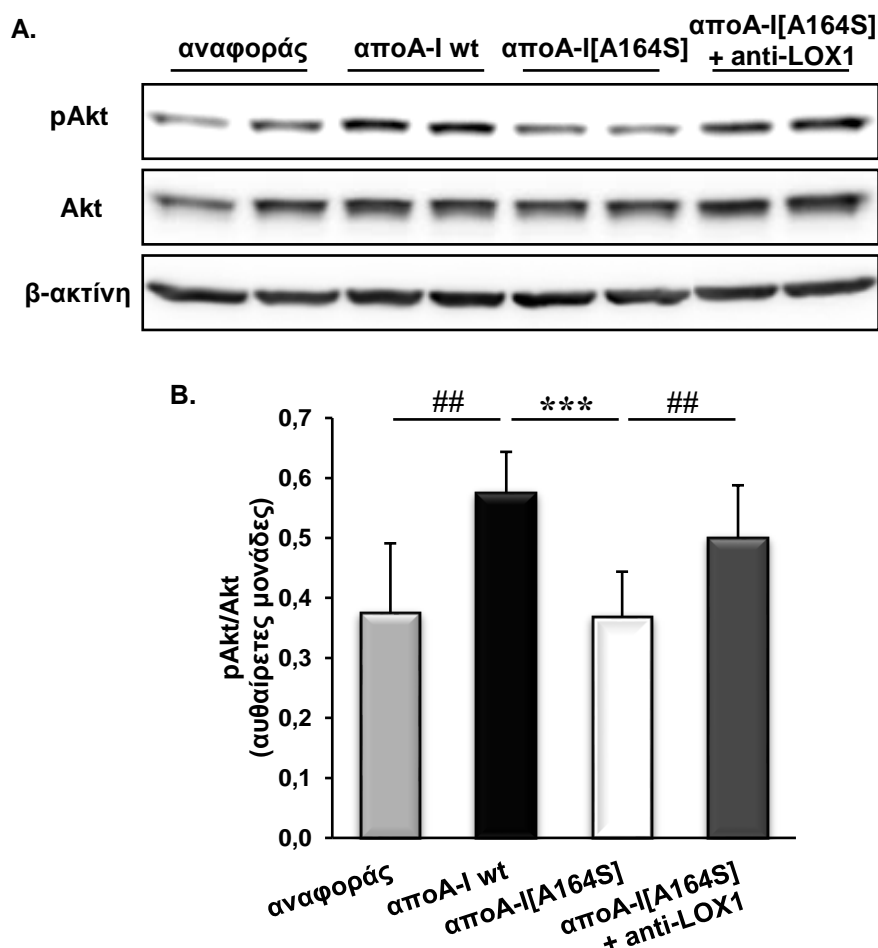
παρουσία rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα EA.hy926 φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (αντικειμενικός φακός 10x) αμέσως μόλις έγινε η χορήγηση των rHDL σωματιδίων (T_{0h}) και μετά το πέρας της 24ωρης επώασης (T_{24h}). Από τις φωτογραφίες του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε η επιφάνεια του κενού σε χρόνο T_{0h} και T_{24h} , με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Image J. **(A)** Ενδεικτικές φωτογραφίες των κυττάρων EA.hy926 πριν (T_{0h}) και μετά την επώαση (T_{24h}) με θρεπτικό μέσο ή με rHDL σωματίδια, απουσία ή παρουσία ειδικού αντισώματος έναντι του LOX-1. **(B)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει το % ποσοστό της επιφάνειας του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} . Η επιφάνεια του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} υπολογίστηκε, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.1. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων. ns: μη στατιστικά σημαντικό (not statistically significant), *** $p < 0,0001$ ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου και ως προς την αποΑ-I[A164S].

Από την ανάλυση διαπιστώθηκε πως η αναστολή του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 με ειδικό αντίσωμα οδήγησε σε αυξημένη μετανάστευση των κυττάρων EA.hy926 ($p < 0,0001$, επιφάνεια του κενού που κάλυψαν σε χρόνο T_{24h} : $37,8 \pm 5,2$) που επωάστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I[A164S], σε σχέση με τα κύτταρα που επωάστηκαν απουσία του αντισώματος έναντι του υποδοχέα LOX-1, με rHDL σωματίδια που περιείχαν την αποΑ-I[A164S] (επιφάνεια του κενού που κάλυψαν σε χρόνο T_{24h} : $29,0 \pm 3,4$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αποΑ-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια εμφάνισε αντίστοιχη ικανότητα με την αποΑ-I άγριου τύπου να επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων EA.hy926 παρουσία του αντισώματος έναντι του υποδοχέα LOX-1.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η αναστολή του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 επαναφέρει στα ίδια επίπεδα με την αποΑ-I άγριου τύπου την ικανότητα της αποΑ-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η αύξηση στη μετανάστευση των κυττάρων EA.hy926 που επωάστηκαν παρουσία ειδικού αντισώματος έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1, με rHDL σωματίδια που περιείχαν την αποΑ-I[A164S] οφείλεται σε ενεργοποίηση της κινάσης Akt, μελετήθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt σε κατάλοιπα σερίνης. Τα κύτταρα EA.hy926 επωάστηκαν για 24 h, με θρεπτικό μέσο άνευ ορού ή με 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ως προς την αποΑ-I) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποΑ-I, απουσία ή παρουσία ειδικού αντισώματος έναντι του

ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 (anti-LOX-1). Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt στα κατάλοιπα σερίνης (pAkt-Ser473) προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση western στα κυτταρικά λύματα. Τα ανοσοαποτυπώματα των πρωτεϊνών (Σχήμα 4.30A) ποσοτικοποιήθηκαν πυκνομετρικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J (Σχήμα 4.30B).



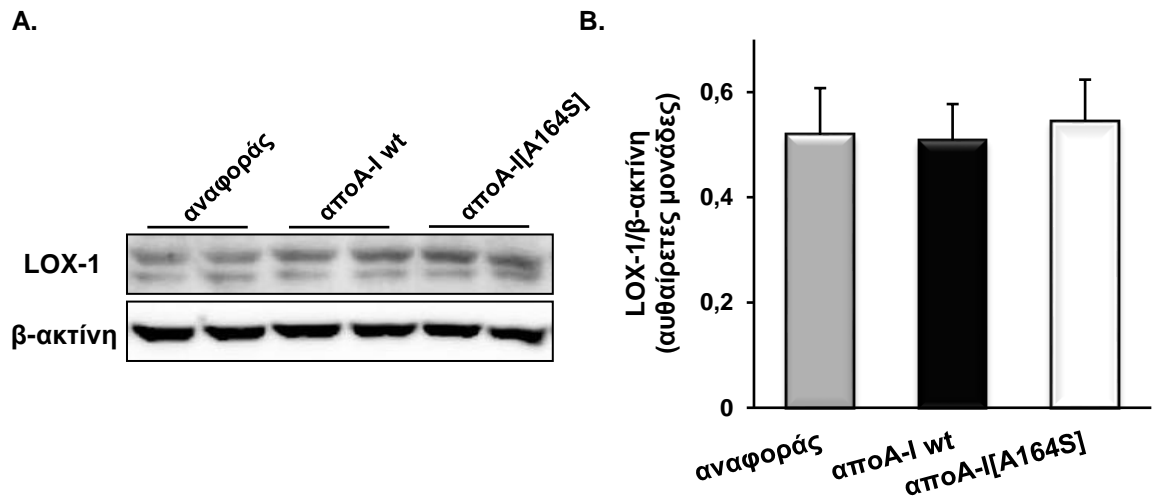
Σχήμα 4.30. Επίδραση της αναστολής του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt από ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία της αποA-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h, με θρεπτικό μέσο άνευ ορού ή με 100 µg/mL (ως προς την αποA-I) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποA-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποA-I, απουσία ή παρουσία 15 µg/mL ειδικού αντισώματος έναντι του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 (anti-LOX-1). Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα λύθηκαν, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.2.2. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης από τα λύματα των κυττάρων αναλύθηκε σε πηκτή 12% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση western με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης Akt στη σερίνη 473 (pAkt-Ser473), της ολικής Akt και της β-ακτίνης. Τα ανοσοαποτυπώματα ποσοτικοποιήθηκαν πυκνομετρικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J. Τα επίπεδα της pAkt-Ser473 στα δείγματα της ίδιας πηκτής κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ολικής Akt. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας (housekeeping gene). **(A)** Ενδεικτικά

ανοσοαποτυπώματα western για τις πρωτεΐνες pAkt, Akt και β-ακτίνη. (B) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τον λόγο pAkt/Akt. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση που προέκυψαν από την πυκνομετρική ανάλυση τεσσάρων ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις διπλούν ή εις τριπλούν. ##p <0,005 ως προς τα κύτταρα αναφοράς και ως προς την αποA-I[A164S], ***p <0,0001 ως προς την αποA-I άγριου τύπου.

Όπως είχε παρατηρηθεί και προηγούμενα, η επώαση των κυττάρων EA.hy926 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I άγριου τύπου οδήγησε σε ενεργοποίηση της κινάσης Akt, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ η επώαση των κυττάρων παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I[A164S] μείωσε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,0001$) τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt στη σερίνη 473, συγκριτικά με την αποA-I άγριου τύπου. Αντιθέτως, διαπιστώθηκε ότι η αναστολή του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 με ειδικό αντίσωμα οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,005$) των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Akt στη σερίνη 473 των κυττάρων που επωάστηκαν παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I[A164S], σε σχέση με τα κύτταρα που επωάστηκαν απουσία του αντισώματος.

Συμπερασματικά, η παρατηρηθείσα αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της Akt πιθανόν να εξηγεί την αποκατάσταση της ικανότητας της αποA-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 στα ίδια επίπεδα με την αποA-I άγριου τύπου, γεγονός που παρατηρήθηκε επίσης κατά την αναστολή του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1. Τα ως άνω δε αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποA-I[A164S] ενεργοποιούν τον ενδοθηλιακό υποδοχέα LOX-1, ο οποίος οδηγεί στην αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt στη σερίνη 473.

Για να διαπιστωθεί εάν η ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 από τα rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποA-I[A164S] οφείλεται σε αλλαγή της έκφρασης του υποδοχέα LOX-1, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασής του σε κύτταρα EA.hy926, κατόπιν επώασης αυτών για 24 h, απουσία ή παρουσία 100 $\mu\text{g/mL}$, ως προς την αποA-I, rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποA-I άγριου τύπου ή την αποA-I[A164S] (Σχήμα 4.31).



Σχήμα 4.31. Επίδραση των αποΑ-Ι άγριου τύπου και αποΑ-Ι[A164S] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα LOX-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, απουσία ή παρουσία 100 µg/mL (ως προς την αποΑ-Ι) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-Ι άγριου τύπου ή την αποΑ-Ι[A164S], για 24 h. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης από τα λύματα κυττάρων αναλύθηκε σε πηκτή 12% v/v πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του LOX-1 και της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Τα ανοσοαποτυπώματα western (A) ποσοτικοποιήθηκαν πυκνομετρικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J. Τα επίπεδα του LOX-1 στα δείγματα της ίδιας πηκτής κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης (B). Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση που προέκυψαν από την πυκνομετρική ανάλυση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις διπλούν ή εις τριπλούν.

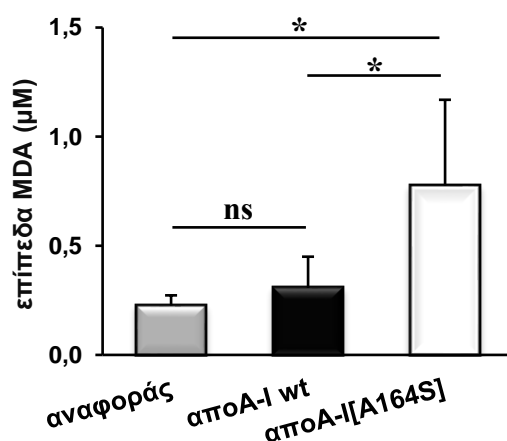
Σύμφωνα με την πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοαποτυπωμάτων, η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-Ι άγριου τύπου ή την αποΑ-Ι[A164S] δεν οδήγησε σε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα LOX-1, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.

4.3.3.6 Προσδιορισμός των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-Ι άγριου τύπου ή την αποΑ-Ι[A164S]

Ο ενδοθηλιακός υποδοχέας LOX-1 είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται από τα προϊόντα οξειδωσης των λιπιδίων^[431]. Έχει δειχθεί *in vitro* ότι η HDL που έχει υποστεί οξειδωτικές τροποποιήσεις από το υποχλωριώδες οξύ ή τα υποχλωριώδη ιόντα (HOCl/CIO⁻) οδήγησε στην ενεργοποίηση του υποδοχέα LOX-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVEC)^[432]. Προκειμένου,

λοιπόν, να μελετηθεί εάν η οξειδωση των λιπιδίων εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1, που παρατηρήθηκε στα κύτταρα EA.hy926 παρουσία των rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I[A164S], εξετάστηκαν τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεΰδης (malondialdehyde, MDA), καθώς αποτελεί ένα φυσικά απαντώμενο προϊόν της υπεροξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί βιβλιογραφικά ότι η συσσώρευση της MDA στην HDL ασθενών με στεφανιαία νόσο διέγειρε την ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1^[206].

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της MDA προσδιορίστηκαν στο υπερκείμενο μέσο των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, τα οποία είχαν επωαστεί για 24 h, απουσία ή παρουσία 100 µg/mL, ως προς την αποΑ-I, rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της MDA έγινε φθορισμομετρικά, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.24 (Σχήμα 4.32).



Σχήμα 4.32. Προσδιορισμός των επιπέδων της MDA σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]. Τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, απουσία ή παρουσία 100 µg/mL (ως προς την αποΑ-I) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S], για 24 h. Μετά το πέρας της επώασης συνελέγη το υπερκείμενο μέσο των κυττάρων και επεξεργάστηκε, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.2.1. Τα επίπεδα της MDA προσδιορίστηκαν φθορισμομετρικά με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου κιτ, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.24. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις τριπλούν. ns: μη στατιστικά σημαντικό (not statistically significant), * $p < 0,01$ ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου και ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

Από την ανάλυση προκύπτει ότι η επώαση των κυττάρων EA.hy926 παρουσία της αποΑ-I[A164S] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια οδήγησε σε

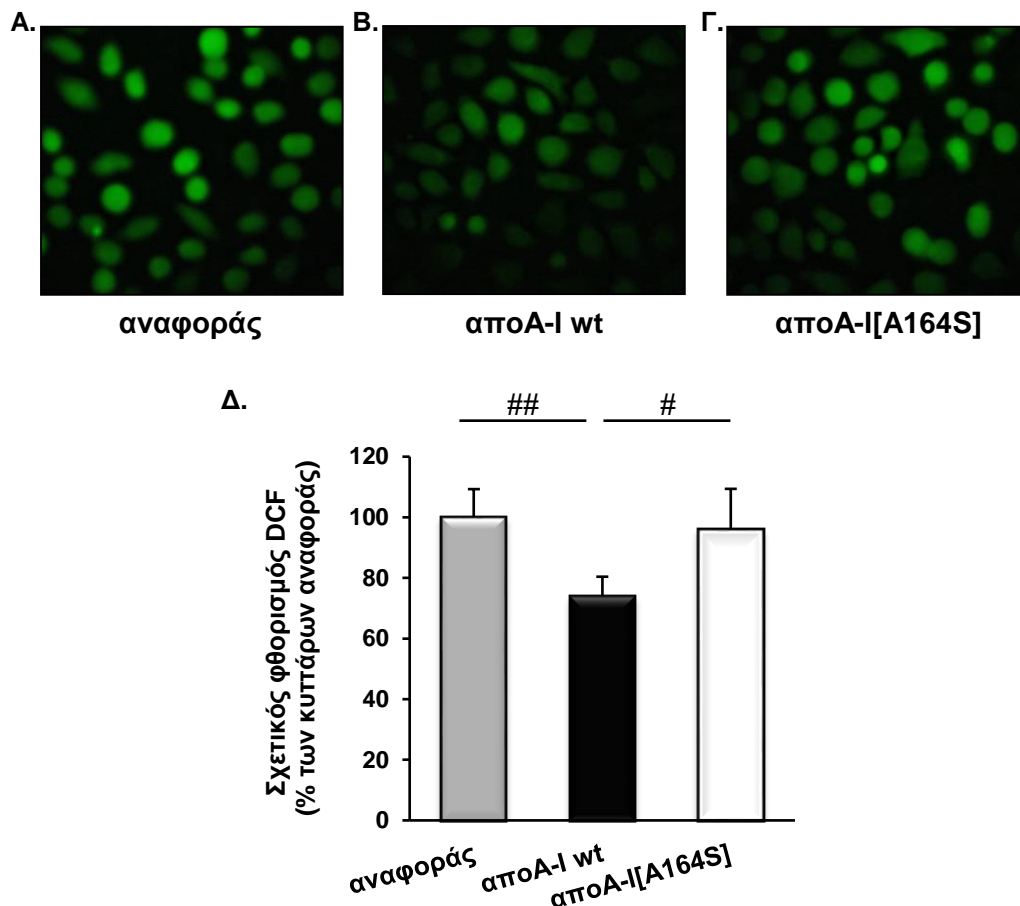
στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) των επιπέδων της MDA, συγκρινόμενα τόσο με την αποΑ-I άγριου τύπου, όσο και με τα κύτταρα αναφοράς. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της MDA μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν παρουσία της αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια και των κυττάρων αναφοράς.

Συμπερασματικά, τα αυξημένα επίπεδα της MDA που παρατηρήθηκαν παρουσία των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I[A164S] πιθανόν εξηγούν την ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1.

4.3.3.7 Προσδιορισμός των επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρουσία δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S]

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η HDL ασκεί σημαντική αντιοξειδωτική δράση στο ενδοθήλιο, προστατεύοντας την LDL από το οξειδωτικό στρες. Η προστατευτική επίδραση της HDL έναντι της οξείδωσης των λιπιδίων οφείλεται εν μέρει στην ικανότητά της να αναστέλλει τον ενδοκυτταρικό σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)^[190]. Για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της μετάλλαξης A164S στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της αποΑ-I/HDL μελετήθηκε η ικανότητα των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I[A164S] να αναστέλλουν τον ενδοκυτταρικό σχηματισμό των ROS.

Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα EA.hy926 επωάστηκαν απουσία ή παρουσία 100 $\mu\text{g/mL}$, ως προς την αποΑ-I, rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[A164S], για 24 h και ακολούθως με τον ευαίσθητο σε συνθήκες οξειδοαναγωγής διοξικό εστέρα της 2',7'-διχλωρο-διϋδροφλουορεσκεΐνης (H_2DCFDA), για 45 min. Ο H_2DCFDA προσλαμβάνεται από τα κύτταρα και υπό τη δράση των κυτταρικών εστερασών μετατρέπεται σε 2',7'-διχλωροδιϋδροφλουορεσκίνη (DCFH), η οποία παγιδεύεται ενδοκυτταρικά. Η οξείδωση της DCFH από τις ROS έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε 2',7'-διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF), η οποία στη συνέχεια ανιχνεύεται με μικροσκοπία φθορισμού (Σχήμα 4.33).



Σχήμα 4.33. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου ή την apoA-I[A164S] στο σχηματισμό ROS από ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, απουσία ή παρουσία 100 μg/mL (ως προς την apoA-I) rHDL σωματιδίων που περιείχαν την apoA-I άγριου τύπου ή την apoA-I[A164S], για 24 h και ακολούθως με H₂DCFDA, για 45 min. Ο σχηματισμός των ROS μετρήθηκε από την ανίχνευση του εκπεμπόμενου από τα κύτταρα φθορισμού της DCF σε μικροσκόπιο φθορισμού (Α-Γ). Από τις φωτογραφίες του κάθε δείγματος μετρήθηκε η ένταση φθορισμού από τουλάχιστον 40 κύτταρα ανά εικόνα, για κάθε δείγμα, με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Image J. Η σχετική ένταση φθορισμού του κάθε δείγματος προέκυψε από τον μέσο όρο των τιμών που συνελέγη από τουλάχιστον 20 φωτογραφίες για κάθε πείραμα. (Δ) Ο φθορισμός των κυττάρων που επωάστηκαν με τις διάφορες μορφές της apoA-I εκφράστηκε ως το % ποσοστό του φθορισμού των κυττάρων αναφοράς (απουσία apoA-I). Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση δύο ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις τριπλούν. #p <0,05 ως προς την apoA-I άγριου τύπου, ##p <0,005 ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

Από τα αποτελέσματα του σχήματος 4.33Δ προκύπτει ότι η επώαση των κυττάρων EA.hy926 παρουσία των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση (p <0,005) των επιπέδων των ROS, σε σχέση με τα κύτταρα που επωάστηκαν απουσία rHDL σωματιδίων. Εν αντιθέσει, η επώαση των κυττάρων EA.hy926 παρουσία των rHDL σωματιδίων

που περιέχουν την αποΑ-I[A164S] οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS, συγκριτικά με τα κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αποΑ-I[A164S] επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των rHDL σωματιδίων, καθώς δεν καταφέρνει να μειώσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS στα κύτταρα EA.hy926. Επιπρόσθετα, η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I[A164S] πιθανόν να δικαιολογεί τα αυξημένα επίπεδα των προϊόντων οξείδωσης, όπως προέκυψε από τον προσδιορισμό των επιπέδων της MDA.

4.4 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας της φυσικά απαντώμενης σημειακής μετάλλαξης V19L της αποΑ-I που σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου και με αυξημένα επίπεδα HDL-C

Παρά τις προόδους που έχουν σημειωθεί στη μείωση των θανατηφόρων καρδιαγγειακών επεισοδίων, η ΚΑΝ συνεχίζει να αποτελεί την πρωταρχική αιτία θανάτου παγκοσμίως^[433,434]. Πληθυσμιακές και κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι τα χαμηλά επίπεδα της HDL-C σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης και ΚΑΝ^[184,406,407,435]. Ωστόσο, αρκετές φαρμακολογικές προσεγγίσεις που είχαν ως στόχο την αύξηση των επιπέδων της HDL-C οδήγησαν μεν σε αύξηση των επιπέδων της, αλλά δεν κατάφεραν να μειώσουν περαιτέρω τον κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς με προϋπάρχουσα στεφανιαία νόσο^[436]. Παράλληλα, μελέτες σε ανθρώπους με δυσλιπιδαιμίες και γενετικά μοντέλα μυών με τροποποιημένο μεταβολισμό της HDL έδειξαν ότι η αύξηση των επιπέδων της HDL-C δε συνοδεύτηκε από μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου ή της εμφάνισης αθηροσκλήρωσης, αντίστοιχα^[242,437]. Εν αντιθέσει, πλήθος μελετών υποστηρίζει ότι η δομή και οι πλειοτροπικές δράσεις της HDL σχετίζονται περισσότερο με την αθηροπροστασία, παρά τα επίπεδα της HDL-C^[186,187,411].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αποΑ-I αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη βιογένεση όσο και στις αθηροπροστατευτικές ιδιότητές της. Μελέτες έχουν δείξει ότι αρκετές κληρονομήσιμες σημειακές μεταλλάξεις στην ανθρώπινη αποΑ-I, όπως οι

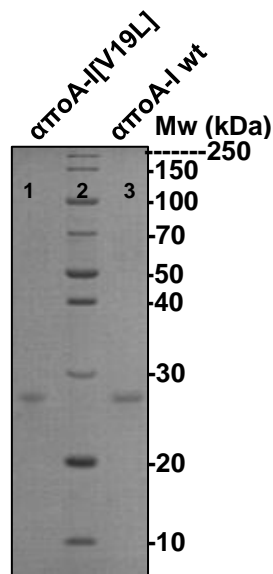
μεταλλάξεις που εξετάστηκαν προηγουμένα, έχουν σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C. Παρόλα αυτά, πρόσφατα εντοπίστηκε στον ισλανδικό πληθυσμό μια νέα μετάλλαξη στην αποΑ-I, η Val19Leu (V19L), η οποία σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα HDL-C και μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ^[179].

Έχοντας ως δεδομένο ότι η φυσικά απαντώμενη σημειακή μετάλλαξη της αποΑ-I, V19L, αποτελεί τη μοναδική μετάλλαξη στην αποΑ-I που έχει σχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ και αυξημένα επίπεδα HDL-C μελετήθηκε η επίδραση αυτής στη δομή και τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποΑ-I/HDL.

4.4.1 Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης αποΑ-I[V19L] σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων

Ο πλασμιδιακός φορέας pET32a-αποΑ-I3C, ο οποίος κωδικοποιεί την έκφραση της ανθρώπινης αποΑ-I, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την εισαγωγή της μετάλλαξης V19L στη cDNA αλληλουχία της αποΑ-I. Η μεταλλαξιγένεση διεξήχθη με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου τυποποιημένου συστήματος (kit) QuickChange II XL site direct mutagenesis (Agilent Technologies), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.11. Η επιτυχία της εισαγωγής της μετάλλαξης επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση DNA (DNA sequencing) του μεταλλαγμένου πλασμιδιακού φορέα.

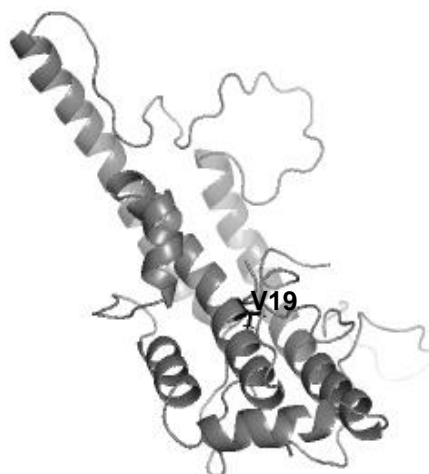
Η ανασυνδυασμένη αποΑ-I[V19L] εκφράστηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21-Gold(DE3) και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.2. Όπως προκύπτει από την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Σχήμα 4.34), η παραχθείσα, μέσω του βακτηριακού συστήματος, αποΑ-I[V19L] ήταν περισσότερο από 95% καθαρή και στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (28.390,9 Da), συγκρινόμενη με την αποΑ-I άγριου τύπου (28.376,9 Da).



Σχήμα 4.34. Ανάλυση σε πηκτή 15% v/v πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων apoA-I άγριου τύπου και apoA-I[V19L] μετά τη διαδικασία αποδιάταξης-επαναδιάταξης. Διαδρομή 1: apoA-I[V19L], Διαδρομή 2: Μοριακός δείκτης, Διαδρομή 3: apoA-I άγριου τύπου.

4.4.2 Βιοφυσική ανάλυση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης apoA-I[V19L] σε ελεύθερη λιπιδίων και λιπιδιωμένη μορφή

Η μετάλλαξη V19L της apoA-I εντοπίζεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην έλικα 1 (αμινοξικά κατάλοιπα 8-35), σύμφωνα με το «συνεναιτικό» μοντέλο της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων ανθρώπινης apoA-I. Έχει προταθεί ότι το αμινο-τελικό άκρο της apoA-I σχηματίζει ένα δεμάτι 6 αμφιπαθητικών α-ελίκων, το οποίο σταθεροποιεί τη δομή της πρωτεΐνης^[85].

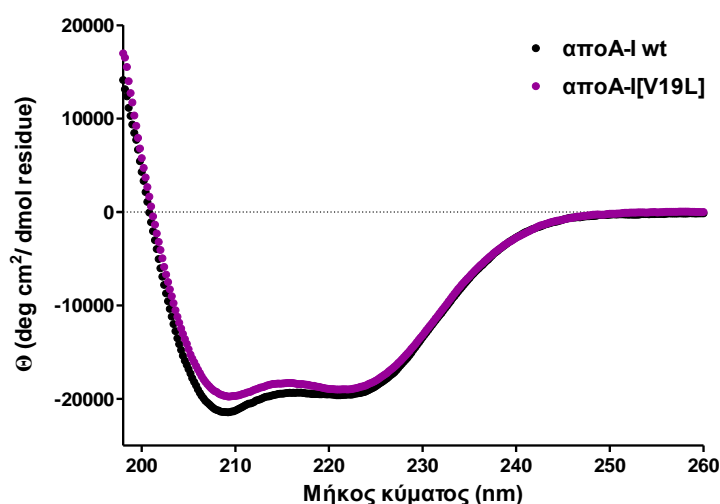


Εικόνα 4.2. Αναπαράσταση του «συνεναιτικού» μοντέλου της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων ανθρώπινης apoA-I, που αναδεικνύει τη θέση της μετάλλαξης V19.

Η ανασυνδυασμένη αποΑ-I[V19L] χαρακτηρίστηκε με βιοφυσικές τεχνικές και συγκρίθηκε με την αποΑ-I άγριου τύπου στα πλαίσια της δευτεροταγούς δομής, της θερμοδυναμικής σταθερότητας, καθώς και της έκτασης της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στον διαλύτη.

4.4.2.1 Μελέτη της ελικότητας της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

Επειδή η σημειακή μετάλλαξη V19L εντοπίζεται σε περιοχή α-έλικας του αμινο-τελικού άκρου της αποΑ-I, μελετήθηκε εάν επηρεάζεται η τοπική δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης, λόγω της ύπαρξης της μετάλλαξης. Για τον σκοπό αυτό, καταγράφηκε το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) της αποΑ-I[V19L] στην περιοχή του άπω υπεριώδους και συγκρίθηκε με το φάσμα CD της αποΑ-I άγριου τύπου, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 4.35.



Σχήμα 4.35. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες της αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L]. Τα φάσματα CD των αποΑ-I ελήφθησαν στην περιοχή του άπω υπεριώδους (198-260 nm), στους 25 °C. Τα φάσματα CD αποτελούν τους μέσους όρους τεσσάρων ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Όπως παρατηρήθηκε από το σχήμα 4.35, το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της αποΑ-I[V19L] περιλαμβάνει μεν τα δύο ελάχιστα στα μήκη κύματος 208 και 222 nm, αντίστοιχα, που είναι χαρακτηριστικά για το μόριο της αποΑ-I, διαφοροποιείται όμως ως προς την ένταση της κορυφής στα 208 nm, συγκρινόμενο με το φάσμα CD της αποΑ-I άγριου τύπου. Στον πίνακα 4.2 αναγράφονται τα εκατοστιαία ποσοστά α-έλικας που προσδιορίστηκαν βάσει της μέσης μοριακής

ελλειπτικότητας στα 208 και 222 nm, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18.2. Επίσης, αναγράφεται ο λόγος του ποσοστού α-έλικας που υπολογίστηκε στα 222 nm προς το ποσοστό α-έλικας που υπολογίστηκε στα 208 nm, ο οποίος παρέχει μια εκτίμηση του επιπέδου των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των α-ελίκων. Ένας λόγος μικρότερος της μονάδας υποδηλώνει την ύπαρξη κανονικών α-ελίκων, ενώ ένας λόγος μεγαλύτερος της μονάδας υποδηλώνει την ύπαρξη δίκλωνων σπειρωμένων σπειραμάτων α-ελίκων^[438,439].

Πίνακας 4.2. Εκατοστιαία ποσοστά α-έλικας των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L], τα οποία προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τεσσάρων τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων.

αποΑ-I	Ελικότητα		
	α-έλικα ₂₂₂ (%)	α-έλικα ₂₀₈ (%)	% α-έλικα ₂₂₂ / % α-έλικα ₂₀₈
wt	57,8 ± 0,9	59,3 ± 1,9	0,98 ± 0,03
V19L	56,4 ± 1,0	52,6 ± 0,9**	1,07 ± 0,002**

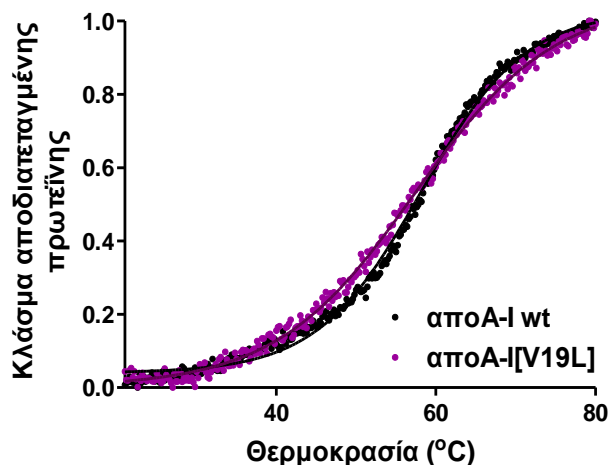
**p <0.001 ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου

Από τις μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού διαπιστώθηκε πως η μετάλλαξη V19L δεν επηρεάζει το περιεχόμενο ποσοστό α-έλικας της πρωτεΐνης στα 222 nm, αλλά μειώνει στατιστικώς σημαντικά (p <0,001) την ελικότητα αυτής στα 208 nm, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με τον αυξημένο λόγο ελικοτήτων που υπολογίστηκε για τη μετάλλαξη V19L, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου, υποδεικνύει ότι η εισαγωγή της μετάλλαξης επηρεάζει την τοπική δευτεροταγή δομή της αποΑ-I και πιθανότατα την τριτοταγή διαμόρφωσή της, οδηγώντας στη δημιουργία σπειρωμένων σπειραμάτων α-ελίκων.

4.4.2.2 Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης της της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου

Δεδομένης της διαταραγμένης δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης αποΑ-I[V19L] έναντι της αποΑ-I άγριου τύπου, εξετάστηκε η επίδραση της μετάλλαξης στη θερμοδυναμική σταθερότητα της αποΑ-I. Τα προφίλ θερμικής αποδιάταξης των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L] καταγράφηκαν, παρακολουθώντας τις αλλαγές της μοριακής ελλειπτικότητας στα 222 nm, συναρτήσεως της μεταβολής της

θερμοκρασίας από τους 20 °C έως τους 80 °C. Στο σχήμα 4.36 παρουσιάζονται οι καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των παραπάνω πρωτεϊνών που προέκυψαν έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε πρότυπη σιγμοειδή καμπύλη Boltzmann.



Σχήμα 4.36. Προφίλ θερμικής αποδιάταξης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης apoA-I[V19L] σε αντιπαραβολή με το προφίλ θερμικής αποδιάταξης της apoA-I άγριου τύπου. Οι αλλαγές του σήματος κυκλικού διχρωϊσμού των apoA-I καταγράφηκαν στα 222 nm, αυξάνοντας τη θερμοκρασία από τους 20 °C στους 80 °C, με ρυθμό μεταβολής 1 °C/min. Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη κατάσταση. Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία, ενώ οι καμπύλες που προέκυψαν από την προσαρμογή των σημείων σε σιγμοειδή καμπύλη Boltzmann αναπαρίστανται με τη συμπαγή γραμμή.

Από τις καμπύλες θερμικής αποδιάταξης προσδιορίστηκαν με μια συμβατική ανάλυση van't Hoff οι θερμοδυναμικές παράμετροι κάθε πρωτεΐνης (βλ. παρ. 3.18.3). Οι τιμές που υπολογίστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3. Παράμετροι που προσδιορίστηκαν από τις καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των apoA-I άγριου τύπου και apoA-I[V19L]. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων.

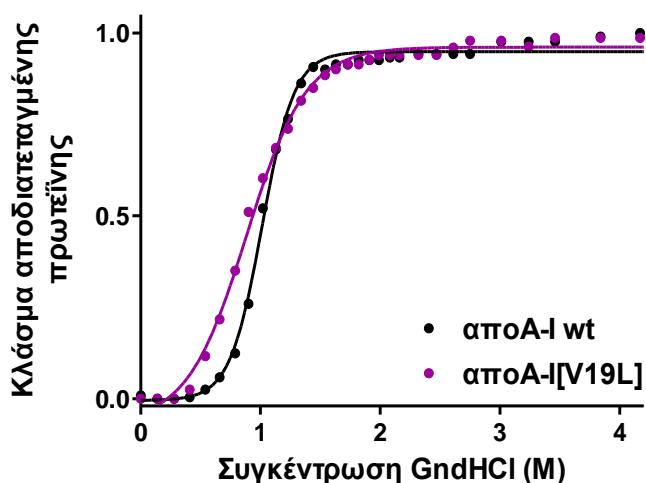
apoA-I	T_m (°C)	Κλίση	n (δείκτης συνεργιστικότητας)	φαινόμενη ΔH_v (kcal/mol)
wt	58,3 ± 0,7	6,7 ± 0,2	5,9 ± 0,5	32,3 ± 0,9
V19L	57,5 ± 0,6	8,7 ± 0,3***	5,5 ± 0,5	24,9 ± 0,7***

***p < 0,0001 ως προς την apoA-I άγριου τύπου

Αν και η μεταλλαγμένη αποΑ-I αποδιατάχθηκε θερμικά στην ίδια θερμοκρασία με την αποΑ-I άγριου τύπου, η μετάβαση από τη διατεταγμένη κατάσταση της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη ήταν λιγότερο απότομη, όπως προκύπτει από το σχήμα της καμπύλης της θερμικής αποδιάταξης (Σχήμα 4.36). Η μειωμένη συνεργιστικότητα κατά την αποδιάταξη της αποΑ-I[V19L], σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου, αντικατοπτρίζεται επίσης στην αύξηση της κλίσης της καμπύλης στο μέσο της μετάβασης, καθώς και στη μείωση της φαινόμενης μεταβολής ενθαλπίας της κατά $\sim 7,4$ kcal/mol, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο προφίλ της αποΑ-I[V19L] υποδηλώνουν πως αυτή η σημειακή μετάλλαξη οδηγεί σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση του μορίου της αποΑ-I.

4.4.2.3 Μελέτη της χημικής αποδιάταξης της αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με την αποΑ-I άγριου τύπου

Η επίδραση της μετάλλαξης V19L στη θερμοδυναμική σταθερότητα της αποΑ-I διερευνήθηκε περαιτέρω με τη μελέτη της πορείας αποδιάταξης που ακολουθεί η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, αποΑ-I[V19L], κατά την τιτλοδότηση του διαλύματός της με αυξανόμενες ποσότητες υδροχλωρικής γουανιδίνης. Στο σχήμα 4.37 παρουσιάζεται η καμπύλη χημικής αποδιάταξης της μεταλλαγμένης αποΑ-I, σε αντιπαραβολή με την καμπύλη αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου.



Σχήμα 4.37. Προφίλ χημικής αποδιάταξης της αποΑ-I[V19L] σε αντιπαραβολή με το προφίλ αποδιάταξης της αποΑ-I άγριου τύπου. Οι αλλαγές του σήματος του εγγενούς φθορισμού των καταλοίπων θρυπτοφάνης καταγράφηκαν κατόπιν τιτλοδότησης των δειγμάτων της αποΑ-I με αυξανόμενες ποσότητες υδροχλωρικής γουανιδίνης. Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη κατάσταση. Τα

πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία, ενώ οι καμπύλες που προέκυψαν από την προσαρμογή των σημείων σε απλή μετάβαση Boltzmann μεταξύ δύο καταστάσεων αναπαρίστανται με τη συμπαγή γραμμή.

Από τις θερμοδυναμικές παραμέτρους που υπολογίστηκαν (Πίνακας 4.4), έπειτα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μοντέλο αποδιάταξης δύο φάσεων, για την αποA-I άγριου τύπου και την αποA-I[V19L] γίνεται αντιληπτό πως η μετάλλαξη V19L οδηγεί σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης.

Πίνακας 4.4. Θερμοδυναμικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα της χημικής αποδιάταξης των αποA-I άγριου τύπου και αποA-I[V19L]. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων.

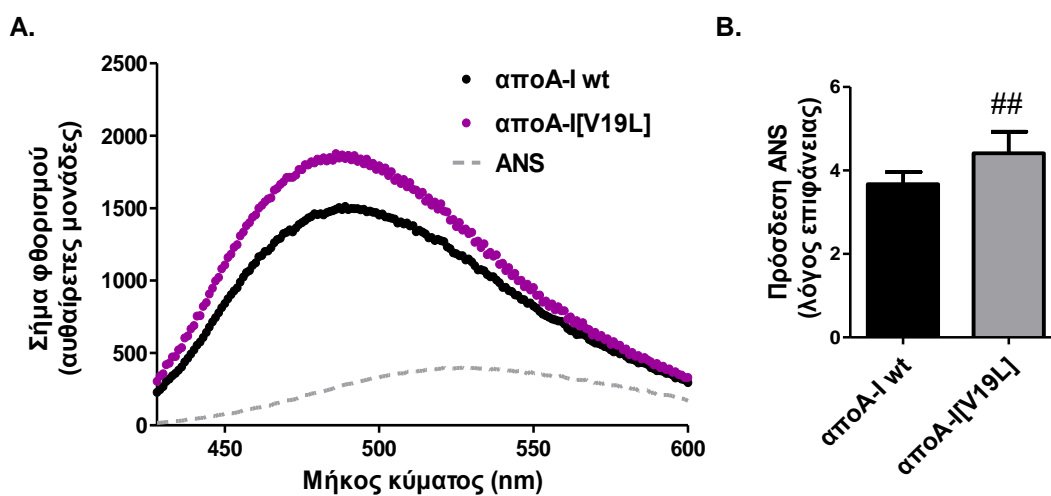
αποA-I	$D_{1/2}$ (M)	φαινόμενη ΔG_D° (kcal/mol)	m (kcal.mol ⁻²)
wt	1,01 \pm 0,02	4,9 \pm 0,6	5,2 \pm 0,6
V19L	0,89 \pm 0,08*	2,3 \pm 0,2***	2,9 \pm 0,4**

*p <0,01, **p <0,001, ***p <0,0001 ως προς την αποA-I άγριου τύπου

Αναλυτικότερα, η μετάλλαξη V19L οδήγησε σε μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική (p <0,05) μετατόπιση της μετάβασης σε μικρότερη συγκέντρωση υδροχλωρικής γουανιδίνης ($D_{1/2}$), συγκριτικά με την αποA-I άγριου τύπου. Επιπρόσθετα, η χημική αποδιάταξη της αποA-I[V19L] ήταν λιγότερη συνεργιστική, συγκρινόμενη με τη χημική αποδιάταξη της αποA-I άγριου τύπου (Σχήμα 4.37), γεγονός που αποτυπώνεται τόσο στη μειωμένη κατά ~2,5 kcal/mol φαινόμενη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG_D°) που παρουσίασε η μετάλλαξη, συγκριτικά με τη ΔG_D° που παρουσίασε η αποA-I άγριου τύπου, όσο και στη μειωμένη κλίση της καμπύλης στο μέσο της αποδιάταξης σε σχέση με την αποA-I άγριου τύπου. Οι παρατηρούμενες μεταβολές υποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη V19L επηρεάζει τη συνολική αναδίπλωση του μορίου της αποA-I και όχι μόνο της περιοχής που εντοπίζεται. Παράλληλα, υποδηλώνεται πως η μετάλλαξη οδηγεί σε μια λιγότερο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης.

4.4.2.4 Μελέτη της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών της αποA-I[V19L] και αποA-I άγριου τύπου στο διαλύτη

Το υδρόφοβο προφίλ της αποA-I[V19L] μελετήθηκε σε αντιπαράβολή με το προφίλ της αποA-I άγριου τύπου, λαμβάνοντας τα φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη ANS παρουσία ή απουσία των αποA-I. Τα φάσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο σχήμα 4.38A. Υπολογίστηκε επίσης το ποσοστό των εκτιθέμενων υδρόφοβων επιφανειών της αποA-I[V19L] στο διαλύτη και συγκρίθηκε με το ποσοστό που υπολογίστηκε για την αποA-I άγριου τύπου (Σχήμα 4.38B).



Σχήμα 4.38. Επίδραση της μετάλλαξης V19L στο υδρόφοβο προφίλ της αποA-I. (A) Φάσματα φθορισμού ANS παρουσία ή απουσία των μορφών της αποA-I. **(B)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τους λόγους του εκπεμπόμενου φθορισμού του ANS παρουσία της αποA-I άγριου τύπου και της αποA-I[V19L] προς τον εκπεμπόμενο φθορισμό του ANS απουσία πρωτεΐνης. ## $p < 0,005$ ως προς την αποA-I άγριου τύπου.

Η αλληλεπίδραση του ANS με την αποA-I[V19L] οδήγησε σε στατιστικά σημαντική ($p < 0,005$) αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού, συγκρινόμενη με την αποA-I άγριου τύπου (Σχήμα 4.38A, B), υποδηλώνοντας ότι η μετάλλαξη V19L οδηγεί στην έκθεση μεγαλύτερης επιφάνειας υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης στον διαλύτη. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα της χημικής αποδιάταξης, σύμφωνα με τα οποία η μετάλλαξη οδηγεί σε μια λιγότερη συμπαγή δομή του μορίου της αποA-I, στην οποία εκτίθεται το δεμάτι των α-ελίκων του αμινο-τελικού άκρου της πρωτεΐνης.

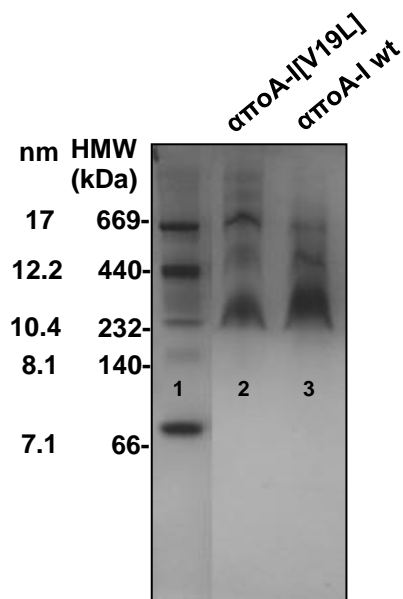
Συνολικά, από τη βιοφυσική ανάλυση της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I[V19L] καταδεικνύεται ότι η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης V19L στο μόριο της

αποΑ-I επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή, καθώς και τη συνολική αναδίπλωση της πρωτεΐνης και οδηγεί σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίησή της.

4.4.2.5 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής και της θερμοδυναμικής σταθερότητας της αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L] ως συστατικών των δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL

Οι δομικές και θερμοδυναμικές αλλαγές που επέφερε η μετάλλαξη V19L στο μόριο της αποΑ-I στάθηκαν αφορμή να διερευνηθεί ακολούθως η επίδρασή της στον σχηματισμό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, καθώς και στη δομική ακεραιότητα της αποΑ-I ως συστατικό των σωματιδίων αυτών. Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν rHDL σωματίδια, τα οποία περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L], φωσφατιδυλοχολίνη (POPC) και χοληστερόλη, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.15.1. Τα rHDL σωματίδια αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.

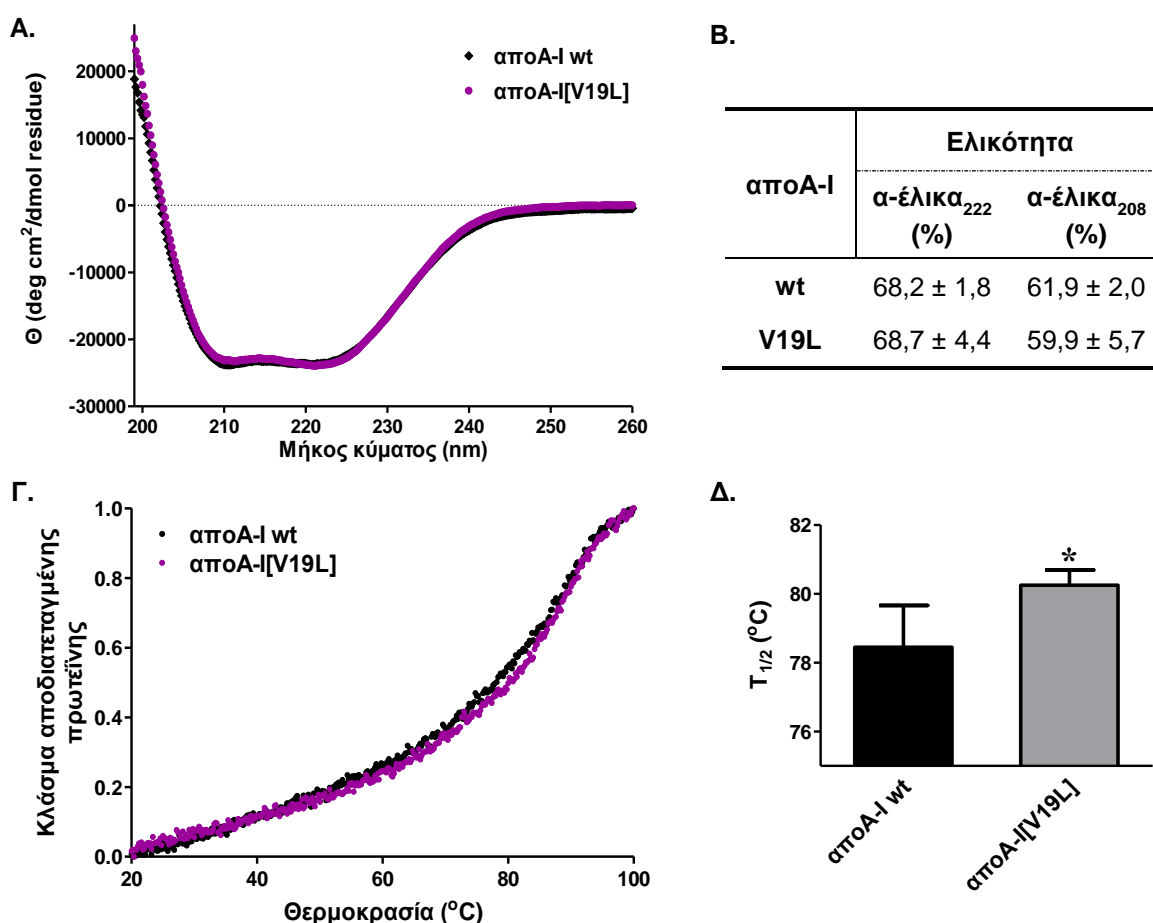
Όπως προκύπτει από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Σχήμα 4.39), η αποΑ-I άγριου τύπου και η μεταλλαγμένη αποΑ-I σχημάτισαν rHDL σωματίδια, τα οποία περιλάμβαναν τρεις αντίστοιχους διακριτούς υποπληθυσμούς, που έχουν αναφερθεί για αυτήν την πρωτεΐνη. Παρατηρήθηκε ωστόσο, ότι η αποΑ-I[V19L] οδήγησε στον σχηματισμό επιπλέον υποπληθυσμών, που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη υδροδυναμική διάμετρο, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου.



Σχήμα 4.39. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας (4-20% v/v) rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L] Διαδρομή 1:

Δείκτης πρωτεϊνών υψηλών μοριακών βαρών και γνωστής υδροδυναμικής διαμέτρου, Διαδρομές 2-3: rHDL σωματίδια που περιέχουν τις αποΑ-I[V19L] (2) και αποΑ-I άγριου τύπου (3).

Από την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες των rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποΑ-I διαπιστώθηκε πως η αποΑ-I[V19L] ανακτά τη δευτεροταγή δομή της, όταν περιέχεται σε rHDL σωματίδια, καθώς παρουσίασε αντίστοιχα ποσοστά α-έλικας με την αποΑ-I άγριου τύπου τόσο στα 222 nm, όσο και στα 208 nm (Σχήμα 4.40Α, Β). Επιπρόσθετα, από το προφίλ θερμικής αποδιάταξης των rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποΑ-I (Σχήμα 4.40Γ) προέκυψε πως η αποΑ-I[V19L] εμφανίζει μια μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$) αύξηση της θερμοκρασίας τήξης ($T_{1/2}$) στο μέσο της μετάβασης (~ 2 °C) (Σχήμα 4.40Δ) της αποδιάταξης, συγκριτικά με την αποΑ-I άγριου τύπου. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως η αποΑ-I[V19L] είναι θερμοδυναμικά πιο σταθεροποιημένη, σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια.



Σχήμα 4.40. Βιοφυσική ανάλυση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L]. (Α). Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες των rHDL

σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου και τη μεταλλαγμένη αποΑ-I. Τα φάσματα προέκυψαν από τον μέσο όρο τεσσάρων ανεξαρτήτων πειραμάτων. **(Β)** Πίνακας που απεικονίζει την εκατοστιαία ελικότητα των αποΑ-I άγριου τύπου και αποΑ-I[V19L] που περιέχονται σε rHDL σωματίδια. Τα περιεχόμενα ποσοστά σε α-έλικα των αποΑ-I υπολογίστηκαν με βάση τη μοριακή ελλειπτικότητα στα 222 nm και στα 208 nm. **(Γ)** Προφίλ θερμικής αποδιάταξης των μορφών της αποΑ-I που περιέχονται σε rHDL σωματίδια. Τα προφίλ της θερμικής αποδιάταξης καθορίστηκαν, παρακολουθώντας τις αλλαγές της μοριακής ελλειπτικότητας στα 222 nm με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 °C στους 100 °C. Ο άξονας των ψ έχει κανονικοποιηθεί έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο κλάσμα της πρωτεΐνης στην αποδιατεταγμένη κατάσταση. Τα πειραματικά δεδομένα που συνελέγησαν αναπαρίστανται ως σημεία. **(Δ)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη θερμοκρασία τήξης ($T_{1/2}$) στο μέσο της μετάβασης της καμπύλης θερμικής αποδιάταξης. $T_{1/2}$: *p < 0,01 ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

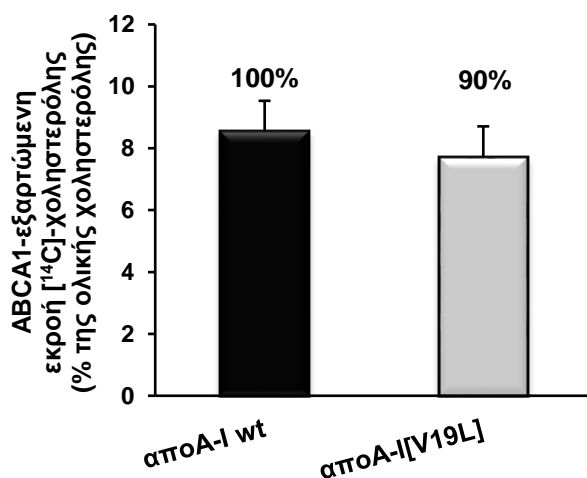
4.4.3 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, αποΑ-I[V19L]

Δεδομένων των δομικών και θερμοδυναμικών αλλαγών που επέφερε η εισαγωγή της μετάλλαξης V19L στο μόριο της αποΑ-I τόσο στην ελεύθερη λιπιδίων, όσο και στη λιπιδιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, αλλά και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μετάλλαξη αυτή σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HDL-C και μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ μελετήθηκε περαιτέρω η επίδραση αυτής στις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της αποΑ-I/HDL. Αναλυτικότερα, εξετάστηκε η ικανότητα της αποΑ-I/ HDL να επάγει εκροή κυτταρικής χοληστερόλης μέσω των μεταφορέων λιπιδίων ABCA1 και ABCG1 και του υποδοχέα της HDL, SR-BI, καθώς και η ικανότητά της να ενεργοποιεί το ένζυμο εστεροποίησης χοληστερόλης LCAT. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I να προάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου κατά τη διάρκεια τραύματος.

4.4.3.1 Μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης V19L στη βιογένεση της HDL

Εφόσον, η μετάλλαξη V19L έχει σχετιστεί με αυξημένα επίπεδα HDL-C, διερευνήθηκε η επίδραση αυτής στην πορεία βιογένεσης της HDL. Πρωτίστως, προσδιορίστηκε η ικανότητα της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I[V19L] να επάγει εκροή κυτταρικής χοληστερόλης από μακροφάγα J774, μέσω του μεταφορέα ABCA1, συγκριτικά με την ικανότητα της αποΑ-I άγριου τύπου (Σχήμα 4.41). Η εξαρτώμενη από τον ABCA1 εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε κατόπιν ενεργοποίησης της

έκφρασης του ABCA1 από το crt-cAMP, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.21.

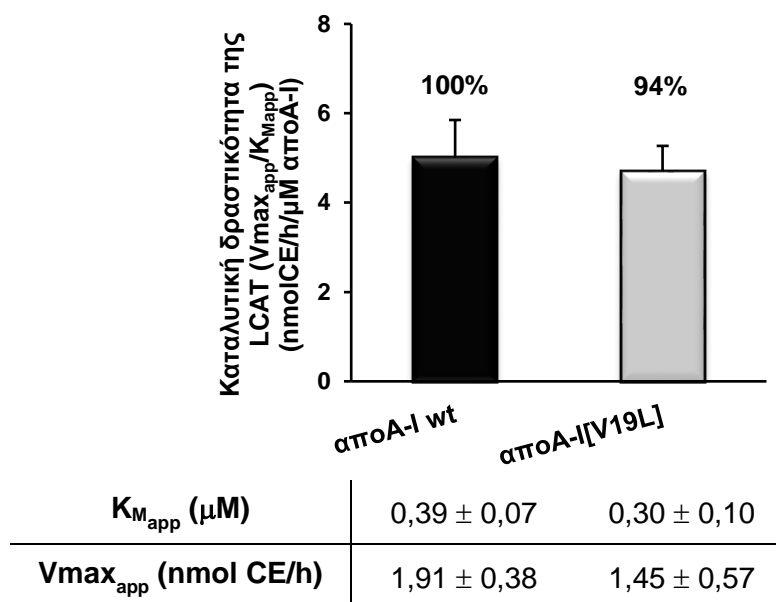


Σχήμα 4.41. ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774 παρουσία 1 μ M αποΑ-I άγριου τύπου ή αποΑ-I[V19L]. Τα κύτταρα J774 επισημάνθηκαν με [14 C]-χοληστερόλη, για 24 h και ακολούθως επώαστηκαν απουσία ή παρουσία 0,3 mM crt-cAMP. Μετά το πέρας της επώασης με το crt-cAMP, τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία ή παρουσία 1 μ M αποΑ-I άγριου τύπου ή αποΑ-I[V19L], για 4 h. Η ABCA1-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης υπολογίστηκε, αφαιρώντας τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης από κύτταρα τα οποία δεν επώαστηκαν με το crt-cAMP από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επώαστηκαν με crt-cAMP. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις τριπλούν. Το ποσοστό της αποΑ-I[V19L] αναφέρεται σε σχέση με το ποσοστό της αποΑ-I άγριου τύπου, το οποίο τέθηκε ως 100%.

Διαπιστώθηκε ότι, η μετάλλαξη V19L δεν επηρεάζει το πρώτο βήμα της πορείας βιογένεσης της HDL, καθώς η αποΑ-I[V19L] παρουσίασε φυσιολογική και αντίστοιχη με την αποΑ-I άγριου τύπου ικανότητα να επάγει εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα J774, μέσω του μεταφορέα ABCA1.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, αποΑ-I[V19L], να επάγει την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, σε αντιπαραβολή με την ικανότητα της αποΑ-I άγριου τύπου. Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν rHDL σωματίδια, επισημασμένα με [14 C]-χοληστερόλη, που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L], όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.15.1. Η ενεργότητα του ενζύμου LCAT εκφράστηκε ως ο ρυθμός παραγωγής επισημασμένων εστέρων χοληστερόλης από rHDL σωματίδια που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποΑ-I. Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκαν σε κινητική Michaelis-Menten και υπολογίστηκαν οι τιμές της φαινόμενης σταθεράς K_{Mapp} , η οποία αποτελεί δείκτη της συγγένειας ενζύμου-

υποστρώματος και της φαινόμενης σταθεράς $V_{max_{app}}$, η οποία αποτελεί δείκτη της ταχύτητας της αντίδρασης. Η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε από τον λόγο $V_{max_{app}}/K_{M_{app}}$ (Σχήμα 4.42).



Σχήμα 4.42. Καταλυτική δραστηριότητα της LCAT ($V_{max_{app}}/K_{M_{app}}$) παρουσία rHDL σωματιδίων που περιείχαν την apoA-I άγριου τύπου ή την apoA-I[V19L]. Η δραστηριότητα της LCAT παρουσία της apoA-I[V19L] αναφέρεται ως ποσοστό, σε σχέση με τη δραστηριότητα της LCAT παρουσία της apoA-I άγριου τύπου, της οποίας το ποσοστό ορίστηκε ως 100%. Οι σταθερές $K_{M_{app}}$ και $V_{max_{app}}$ προσδιορίστηκαν από τις αντιδράσεις κινητικής, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.16. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση δύο τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που διεξήχθησαν εις διπλούν. CE: εστέρες χοληστερόλης (cholesteryl esters).

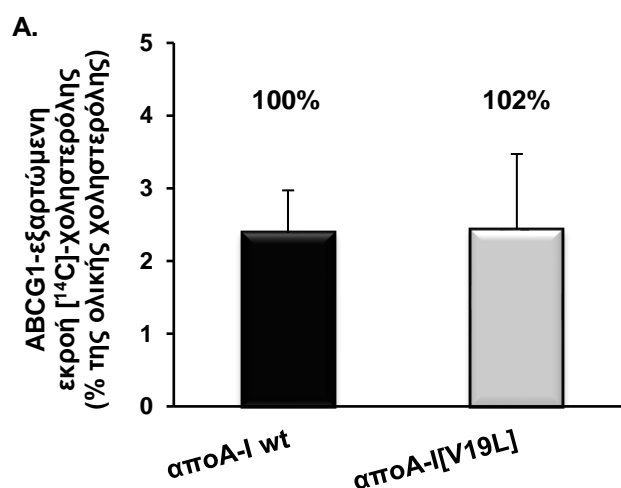
Η ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από την apoA-I[V19L] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια ήταν αντίστοιχη της ενεργοποίησης του ενζύμου από την apoA-I άγριου τύπου. Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη V19L δεν επηρεάζει τη βιογένεση της HDL.

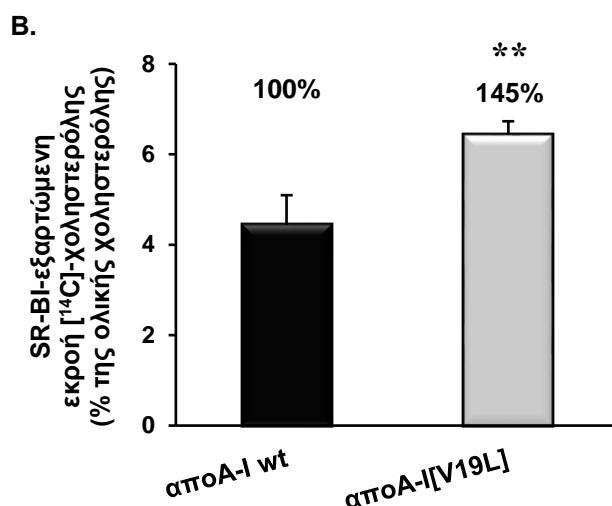
4.4.3.2 Μελέτη της επίδρασης της μετάλλαξης V19L στην ικανότητα της λιπιδιωμένης apoA-I να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορά λιπιδίων ABCG1 ή μέσω του υποδοχέα της HDL, SR-BI

Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της αποτελεσματικότητας της πορείας RCT και της καρδιαγγειακής νόσου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η HDL διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο σε όλα τα στάδια της πορείας RCT. Ένα από αυτά περιλαμβάνει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αγγείων προς την HDL, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1 και

του υποδοχέα της HDL, SR-BI^[195]. Επειδή η μετάλλαξη V19L έχει σχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, μελετήθηκε αν το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη ικανότητα της HDL που περιέχει την αποΑ-I-[V19L] να επάγει την εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα.

Για τη μελέτη αυτή παρασκευάστηκαν rHDL σωματίδια που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L], φωσφολιπίδια και χοληστερόλη με αρχική μοριακή αναλογία 100:10:1, ως προς φωσφολιπίδια (POPC): χοληστερόλη: αποΑ-I, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.15.1. Κύτταρα HEK293 επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης pcDNA3.1-ABCG1 ή pcDNA3.1-SR-BI που φέρει το cDNA της αλληλουχίας του ανθρώπινου ABCG1 ή του ανθρώπινου SR-BI, αντίστοιχα ή με τον φορέα έκφρασης pcDNA3.1 απουσία ενθέματος (mock), επισημάνθηκαν με [¹⁴C]-χοληστερόλη και επωάστηκαν παρουσία ή απουσία αυτών των rHDL σωματιδίων. Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) ABCG1 και SR-BI- εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης, τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο mock αφαιρέθηκαν από τα ποσοστά εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης pcDNA3.1-ABCG1 ή pcDNA3.1-SR-BI, αντίστοιχα. Η τιμή του ποσοστού της επαγόμενης από τον ABCG1 ή τον SR-BI εκροής χοληστερόλης παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ορίστηκε ως 100% (Σχήμα 4.43A, B).





Σχήμα 4.43. ABCG1 και SR-BI-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης από κύτταρα HEK293 παρουσία rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L].

Κύτταρα HEK293 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 ή του SR-BI ή με το πλασμίδιο pcDNA3.1, επισημάνθηκαν με [¹⁴C]-χοληστερόλη για 20 h και επωάστηκαν για 4 h, παρουσία ή απουσία 1 μM rHDL σωματιδίων, ως προς την αποΑ-I, που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L]. Η ABCG1 (**A**) και η SR-BI-εξαρτώμενη εκροή χοληστερόλης (**B**) υπολογίστηκαν, αφαιρώντας την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1 από την τιμή της εκροής χοληστερόλης των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης του ABCG1 ή του SR-BI, αντίστοιχα. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση τριών τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Οι αριθμοί στην κορυφή των στηλών αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά της εξαρτωμένης από τον ABCG1 και SR-BI εκροής χοληστερόλης και αναφέρονται σε σχέση με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια, της οποίας το ποσοστό ορίζεται ως 100%. **p < 0,001 ως προς την αποΑ-I άγριου τύπου.

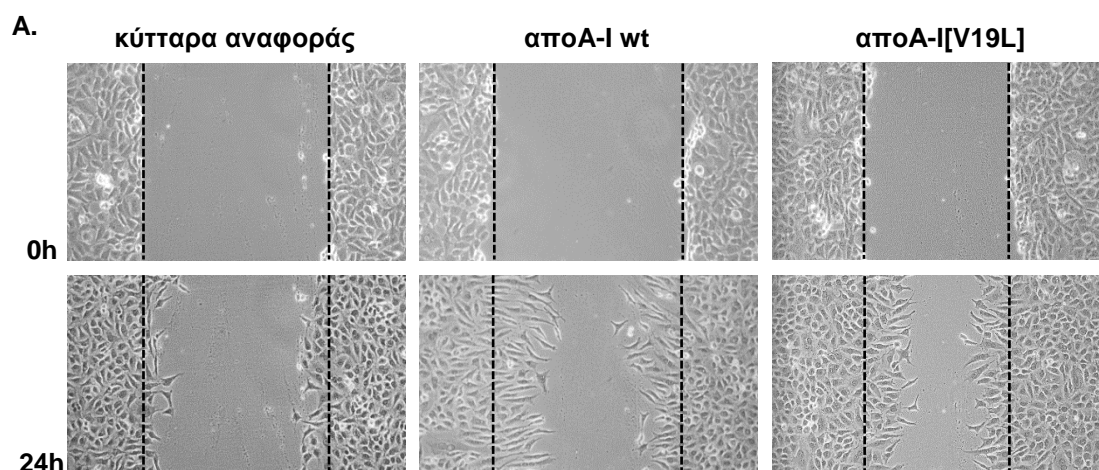
Από την ανάλυση διαπιστώθηκε πως τα rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I[V19L] παρουσίασαν αντίστοιχη με αυτήν της αποΑ-I άγριου τύπου, που περιέχεται σε rHDL σωματίδια, ικανότητα να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1. Εν αντιθέσει, η ικανότητα των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I[V19L] να επάγουν εκροή χοληστερόλης μέσω του υποδοχέα της HDL, SR-BI, ήταν αυξημένη κατά 45% (p < 0,005), συγκρινόμενη με την ικανότητα των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου.

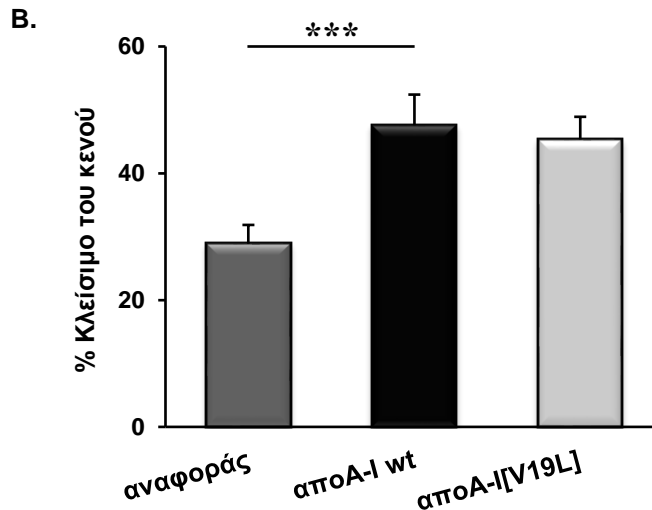
Συμπερασματικά, η αυξημένη ικανότητα της αποΑ-I[V19L] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια θα μπορούσε να δικαιολογήσει τα αυξημένα επίπεδα HDL-C που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες τη μετάλλαξη, καθώς ο SR-BI διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των επιπέδων της HDL-C στο πλάσμα^[195]. Επιπλέον, η αυξημένη αλληλεπίδραση της λιπιδιωμένης αποΑ-I[V19L] με τον SR-

ΒΙ θα μπορούσε να υποστηρίξει το αθηροπροστατευτικό δυναμικό της apoA-I[V19L], καθώς έχει προταθεί ότι η επαγόμενη εκροή χοληστερόλης από τον SR-ΒΙ προστατεύει τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος από τη συσσώρευση της χοληστερόλης.

4.4.3.3 Μελέτη της επίδρασης της σημειακής μετάλλαξης V19L στην ικανότητα της λιπιδιωμένης apoA-I να επάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της μετάλλαξης V19L στις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της apoA-I/HDL μελετήθηκε η ικανότητα των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την apoA-I άγριου τύπου ή την apoA-I[V19L] να επάγουν τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς έχει προταθεί ως ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η HDL συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου^[198]. Για τη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε η *in vitro* δοκιμασία προσομοίωσης επούλωσης πληγών (wound healing assay) στη σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.3.3.3. Στο σχήμα 4.44A παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας πριν (T_{0h}) και μετά (T_{24h}) την επώαση των κυττάρων EA.hy926 με τα rHDL σωματίδια. Η επίδραση των rHDL σωματιδίων στην κυτταρική μετανάστευση εκφράστηκε ως το % ποσοστό της επιφάνειας του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} (Σχήμα 4.44B).





Σχήμα 4.44. Επίδραση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη αποΑ-I, αποΑ-I[V19L] στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Στη μονοστιβάδα της καλλιέργειας των κυττάρων EA.hy926 προκλήθηκε τεχνητή πληγή με τη χρήση ακρορυγχίου (200 μ L) αυτόματης πιπέττας και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h, με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, παρουσία ή απουσία 100 μ g/mL rHDL σωματιδίων (ως προς την αποΑ-I) που περιείχαν την αποΑ-I άγριου τύπου ή την αποΑ-I[V19L]. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των rHDL σωματιδίων στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα EA.hy926 φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (αντικειμενικός φακός 10x) αμέσως μόλις έγινε η χορήγηση των rHDL σωματιδίων (T_{0h}) και μετά το πέρας της 24ωρης επώασης (T_{24h}). Από τις φωτογραφίες του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε η επιφάνεια του κενού σε χρόνο T_{0h} και T_{24h} , με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Image J. **(A)** Ενδεικτικές φωτογραφίες των κυττάρων EA.hy926 πριν (T_{0h}) και μετά την επώαση (T_{24h}) παρουσία ή απουσία των rHDL σωματιδίων. **(B)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει το % ποσοστό της επιφάνειας του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} . Η επιφάνεια του κενού που κάλυψαν τα κύτταρα σε χρόνο T_{24h} υπολογίστηκε, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.23.1. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση τεσσάρων τουλάχιστον ανεξαρτήτων πειραμάτων. *** $p < 0,0001$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς

Όπως είχε δειχθεί και προηγούμενα, τα rHDL σωματίδια που περιέχουν την αποΑ-I άγριου τύπου είναι ικανά να επάγουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,0001$) της μετανάστευσης των EA.hy926 εντός της τεχνητής πληγής, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Από την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι η αποΑ-I[V19L] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια εμφάνισε αντίστοιχη ικανότητα με την αποΑ-I άγριου τύπου να επάγει την κυτταρική μετανάστευση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Χαρακτηρισμός των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL ατόμων με Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα

Οι αυτοάνοσες ρευματικές παθήσεις έχουν συσχετιστεί με αθηροσκλήρωση και αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας^[261]. Η διαταραχή των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL έχει μελετηθεί ως ένας μηχανισμός που οδηγεί σε αυξημένο αθηροσκληρωτικό κίνδυνο για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) και το συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ)^[263-266]. Ωστόσο, η προέκταση αυτών των συμπερασμάτων στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ), η οποία επίσης είναι αυτοάνοση ρευματική πάθηση, θα πρέπει να γίνεται με προσοχή, λόγω των σημαντικών διαφορών στην παθολογία της, σε σχέση με τη ΡΑ και το ΣΕΛ. Συγκεκριμένα, η ΡΑ και ο ΣΕΛ χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών αυτοαντισωμάτων που ενδέχεται να προκαλούν συστηματική φλεγμονή, μια παθολογία που απουσιάζει από την ΑΣ^[270,271]. Επειδή η συστηματική φλεγμονή θα μπορούσε να αποτελεί τον λόγο της διαταραχής της εξαρτώμενης από την HDL αθηροπροστασίας στη ΡΑ και το ΣΕΛ, αυτό το ζήτημα θα πρέπει να αντιμετωπιστεί ξεχωριστά στην ΑΣ. Περαιτέρω, μελέτες αναφέρουν αυξημένα επίπεδα του συσχετιζόμενου με την HDL αμυλοειδούς Α του ορού (serum amyloid A, SAA) και μειωμένη δραστικότητα της PON1 του πλάσματος σε ασθενείς με ενεργή ΑΣ, υποδηλώνοντας διαταραχή των αντιαθηρογόνων ιδιοτήτων της HDL^[262,386,440].

Στην παρούσα μελέτη, καταδεικνύεται ότι οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL, όπως η ικανότητα εκροής χοληστερόλης και η αντιοξειδωτική ιδιότητα, διαταράσσονται επίσης σε ασθενείς με ΑΣ. Επιπρόσθετα, οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL είναι διαταραγμένες σε ασθενείς με ΑΣ, παρά το γεγονός ότι όλοι οι ασθενείς είχαν λάβει θεραπεία σχετιζόμενη με τη νόσο και η νόσος βρισκόταν κλινικά υπό έλεγχο. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι αλλαγές στις λειτουργίες της HDL μπορεί να προκληθούν ακόμα και απουσία συστηματικής φλεγμονής και παραμένουν επίμονες ακόμα και όταν η ασθένεια είναι κλινικά διαχειριζόμενη.

Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών με ΑΣ και των ατόμων αναφοράς ήταν, σε όλες τις περιπτώσεις, ανεπηρέαστες από την κανονικοποίηση των πειραματικών δεδομένων προς τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης (HDL-C), επιβεβαιώνοντας

ότι τα αποτελέσματα αντανακλούν διαφορές στη σύσταση και τη λειτουργικότητα της HDL και όχι στην ποσότητα της HDL-C. Ειδικότερα, διαπιστώνεται ότι παρά τα φυσιολογικά επίπεδα της HDL-C και της apoA-I στον ορό, οι ασθενείς με ΑΣ έχουν HDL με μειωμένη ικανότητα να προάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα κύτταρα, διαταραγμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου PON1 και αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου MPO. Επιπλέον, σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτριο Θεοφιλάτο από το εργαστήριο του Δρ. Δ. Καρδάση (Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης και Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα) βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ΑΣ έχουν HDL με μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης της κινάσης Akt στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.

Πληθυσμιακές και κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η ικανότητα της HDL να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα συσχετίζεται αντίστροφα με το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων αρτηριών (intima-media thickness, IMT), την πιθανότητα στεφανιαίας νόσου^[244], καθώς και με την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε άτομα χωρίς προηγούμενο ιστορικό ΚΑΝ^[377]. Επιπρόσθετα, οι προφλεγμονώδεις/ αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL αποδείχθηκε ότι διακρίνουν τους ασθενείς με ΚΑΝ ή με σχετιζόμενη ΚΑΝ από τα άτομα ελέγχου καλύτερα από τα επίπεδα της HDL-C^[186] και συσχετίστηκαν με αυξημένο επιπολασμό των καρωτιδικών πλακών και με υψηλότερο IMT σε ασθενείς με ΣΕΛ^[441]. Συνεπώς, η διαταραχή της εκροής χοληστερόλης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL σε ασθενείς με ΑΣ μπορεί εν μέρει να αποτελεί τη βάση της αυξημένης θνησιμότητας λόγω ΚΑΝ σε αυτήν την ομάδα ασθενών.

Έχει δειχθεί ότι υπό συνθήκες οξείας ή χρόνιας φλεγμονής η HDL μπορεί να μετατραπεί από αντιφλεγμονώδη σε προφλεγμονώδη, λόγω μεταβολών της πρωτεομικής και λιπιδιομικής σύστασής της^[189,373]. Οι μεταβολές της πρωτεομικής σύστασης της HDL μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη δραστικότητα της PON1 και αυξημένη δραστικότητα της MPO^[442,443], η οποία έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την ικανότητα της HDL να προάγει την εκροή χοληστερόλης^[380,443]. Αμφότερες οι δραστικότητες των ενζύμων PON1 και MPO έχουν συνδεθεί με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο^[444,445]. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε μειωμένη και αυξημένη δραστικότητα των ενζύμων PON1 και MPO, αντίστοιχα, σε ασθενείς με ΑΣ, σε σχέση με τα άτομα αναφοράς. Καμία από τις δραστικότητες των δύο ενζύμων δε συσχετίστηκε με την ικανότητα της HDL ασθενών με ΑΣ να επάγει εκροή

χοληστερόλης, υποδηλώνοντας ότι άλλες μεταβολές στη σύσταση της HDL ή άλλοι παράγοντες ευθύνονται για τη μειωμένη ικανότητα εκροής χοληστερόλης της HDL σε αυτούς τους ασθενείς. Ανεξάρτητα από αυτό το γεγονός, η δραστικότητα της MPO βρέθηκε να συσχετίζεται με τη μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL ασθενών με ΑΣ, παρόμοια με ότι είχε δείχθει προηγουμένα για ασθενείς με ΡΑ^[263].

Μια προηγούμενη μελέτη υποστηρίζει ότι η μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου PON1 σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο οδήγησε σε μείωση της φωσφορυλίωσης της ενδοθηλιακής κινάσης Akt στη σερίνη 473, αναστολή της ενεργοποίησης της eNOS και επακόλουθη απώλεια των ενδοθηλιακών αντιφλεγμονωδών επιδράσεων και ενδοθηλιακών μηχανισμών επιδιόρθωσης που διεγείρονται από την HDL^[206]. Μια άλλη μελέτη κατέδειξε ότι η HDL που έχει τροποποιηθεί οξειδωτικά από την MPO έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt σε ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και τη μειωμένη ενδοθηλιακή αποκατάσταση σε μυς^[446]. Η HDL ασθενών με ΑΣ επέδειξε μειωμένη ικανότητα φωσφορυλίωσης της ενδοθηλιακής κινάσης Akt στη σερίνη 473, συγκρινόμενη με την HDL των ατόμων αναφοράς. Η μείωση αυτή όμως δε συσχετίστηκε με τη δραστικότητα των ενζύμων PON1 ή MPO, όταν όλες οι μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν προς τα επίπεδα της HDL-C. Ωστόσο, η μείωση αυτή συσχετίστηκε με τον λόγο MPO/PON1, υποδεικνύοντας μια συνδυαστική επίδραση των μεταβολών της σύστασης της HDL στη φωσφορυλίωση της ενδοθηλιακής Akt και την επακόλουθη σηματοδότηση. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με μια πρόσφατη μελέτη που προτείνει τον λόγο MPO/PON1 ως δυνητικό δείκτη της δυσλειτουργικής HDL^[389].

Ο λόγος pAkt/Akt στα ενδοθηλιακά κύτταρα έδειξε θετική συσχέτιση με την εξαρτώμενη από την HDL εκροή χοληστερόλης στα άτομα αναφοράς και ασθενέστερη, αλλά στατιστικώς σημαντική, συσχέτιση στους ασθενείς με ΑΣ. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως υποδηλώνει ότι η εκροή χοληστερόλης μπορεί να ενεργοποιήσει οδούς σηματοδότησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η διαταραχή της ικανότητας εκροής χοληστερόλης της HDL να επηρεάζει επίσης την επαγόμενη από την HDL σηματοδότηση. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διασαφηνιστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επαγόμενης από την HDL σηματοδότησης και των πορειών εκροής χοληστερόλης.

Συνολικά, εξ όσων είναι γνωστά, αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη που αξιολογεί τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, την ικανότητα εκροής χοληστερόλης, καθώς

και την ικανότητα σηματοδότησης της HDL ασθενών με ΑΣ. Η διαταραχή των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ΑΣ προτείνει μια μοριακή σύνδεση μεταξύ της ΑΣ και της ΚΑΝ. Το γεγονός ότι η νόσος στην ομάδα μελέτης της παρούσας εργασίας ήταν ουσιαστικά ελεγχόμενη, λόγω θεραπείας, αναδεικνύει πως οι διαταραχές των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL που διαπιστώθηκαν στους ασθενείς με ΑΣ δεν εξαρτώνται από επίμονη υψηλά ενεργή, φλεγμονώδη κατάσταση. Είναι πιθανό ότι ειδικοί μεσολαβητές των χρόνιων ανοσολογικών αποκρίσεων ή άλλων γενετικών παραγόντων μπορούν να επηρεάσουν τις λειτουργίες της HDL με τέτοιο τρόπο που δεν επιτρέπει την ανάκτηση αυτών σε φυσιολογικά επίπεδα όταν η νόσος είναι υπό έλεγχο. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν καινοφανή εικόνα του αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου που παρατηρείται στην ΑΣ^[260,267,268,447,448], υποδεικνύοντας ότι η ΑΣ επηρεάζει τη σύσταση και λειτουργία της HDL και αυτό μπορεί να οδηγεί σε αυξημένη αθηροσκλήρωση και αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Συνεπώς, η λειτουργική ακεραιότητα της HDL μπορεί να είναι ένας σημαντικός, ακόμη ανεξερεύνητος, προγνωστικός δείκτης για την αξιολόγηση του κινδύνου αθηροσκλήρωσης και ΚΑΝ σε ασθενείς με ΑΣ.

5.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης αποΑ-I σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων

Για τη μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων στο μόριο της αποΑ-I κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη ενός απλού και αποδοτικού πρωτοκόλλου έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης. Η προσέγγιση βασίστηκε στην έκφραση μέσω βακτηριακών κυττάρων *E.coli* της χιμαιρικής αποΑ-I, η οποία είναι συντηγμένη ανοδικά του αμινο-τελικού άκρου της με ετικέτα έξι ιστιδινών (6x His-tag) και ετικέτα θειορεδοξίνης (Trx-tag) και ακόλουθη απομάκρυνση του συντήγματος Trx-His με τη χρήση της υψηλής ειδικότητας πρωτεάσης 3C. Το ίδιο πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού, με ορισμένες μικρές τροποποιήσεις, χρησιμοποιείται εκτενώς στο εργαστήριο για την παραγωγή των διάφορων ισομορφών της αποΕ, καθώς και μεταλλαγμένων μορφών αυτών^[312,449-453]. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε οδηγεί στη γρήγορη, αποτελεσματική και με υψηλή απόδοση παραγωγή της σωστής δομικά αποΑ-I, όπως καταδεικνύεται από τη βιοφυσική ανάλυση. Η αποΑ-I που παρήχθη μέσω

του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου παρουσιάζει όμοια δομικά χαρακτηριστικά με την αποΑ-I που παράγεται μέσω διαφορετικών βακτηριακών^[397,454], αλλά και ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης^[123,124,160,172]. Το ίδιο πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού εφαρμόστηκε επιτυχώς για την παραγωγή των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

5.3 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων της αποΑ-I που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C

Ο καίριος ρόλος της αποΑ-I στη βιογένεση, τη δομή, καθώς και στις αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL υποστηρίζεται από πληθώρα μελετών^[14,455-457]. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν περιγραφεί αρκετές φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο της αποΑ-I, οι οποίες οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης, αλλά η συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων με τη λειτουργικότητα της αποΑ-I παραμένει αδιευκρίνιστη στην πλειονότητα των περιπτώσεων^[26,410,458,459]. Τρεις τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν οι φυσικά απαντώμενες σημειακές μεταλλάξεις Leu144Arg (L144R), Ala164Ser (A164S) και Leu178Pro (L178P) της αποΑ-I, οι οποίες έχουν εντοπιστεί σε ισπανικό, δανέζικο και ολλανδικό πληθυσμό, αντίστοιχα και έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΑΝ ή/και με χαμηλά επίπεδα HDL-C στο πλάσμα^[176-178]. Στην παρούσα, λοιπόν, διατριβή εξετάστηκε η επίδραση των τριών σημειακών μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P στη δομή της ελεύθερης λιπιδίων και λιπιδιωμένης αποΑ-I με μια σειρά ευρέως χρησιμοποιούμενων βιοφυσικών μεθόδων, καθώς και με τη διεξαγωγή προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, στην περίπτωση των ελεύθερων λιπιδίων μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση αυτών των μεταλλάξεων στις λειτουργίες και τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποΑ-I και της HDL.

Η βιοφυσική ανάλυση των ελεύθερων λιπιδίων πρωτεϊνών αποΑ-I[L144R], αποΑ-I[A164S] και αποΑ-I[L178P] αναδεικνύει ότι και οι τρεις σημειακές μεταλλάξεις επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της αποΑ-I, μειώνοντας το περιεχόμενο ποσοστό α-έλικας και οδηγούν σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης κατά τη θερμική και χημική αποδιάταξή της. Η μετάλλαξη L178P επέφερε τις μεγαλύτερες διαταραχές στη δομική ακεραιότητα του

μορίου της apoA-I, υποδεικνύοντας μια λιγότερο σταθερή τριτοταγή δομή για αυτήν την πρωτεΐνη. Συνολικά, τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P επιφέρουν αλλαγές στη συνολική αναδίπλωση και διαμόρφωση του μορίου της apoA-I. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται επίσης από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, όπου διαπιστώθηκε ότι και οι τρεις μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν τη διαμορφωτική σταθερότητα της apoA-I. Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή της ελεύθερης λιπιδίων ελλειμματικής μορφή της apoA-I στο αμινο-τελικό άκρο, apoA-I[Δ(1-43)]^[79] (Εικόνα 4.1), η οποία προσομοιάζει περισσότερο τη δομή της apoA-I στα δισκοειδή HDL σωματίδια, τα κατάλοιπα της λευκίνης στις θέσεις 144 και 178 της αμινοξικής αλληλουχίας της apoA-I προσανατολίζονται εσωτερικά προς τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, που σχηματίζουν τη διπλοστιβάδα. Η μεταλλαγή των καταλοίπων της Leu144 και της Leu178 σε αργινίνη και προλίνη, αντίστοιχα, αναμένεται να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις της apoA-I με τα λιπίδια. Αντιθέτως, το κατάλοιπο της αλανίνης στη θέση 164 της αμινοξικής αλληλουχίας της apoA-I προσανατολίζεται προς την εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης, η οποία βρίσκεται σε επαφή με τον διαλύτη. Το γεγονός αυτό αντανάκλα ότι η μετάλλαξη A164S πιθανόν να συμπεριφέρεται διαφορετικά από τις μεταλλάξεις L144R και L178P κατά την αλληλεπίδρασή της με τα λιπίδια.

Η βιοφυσική ανάλυση των rHDL σωματιδίων που περιέχουν τις apoA-I[L144R] και apoA-I[L178P] έδειξε ότι οι μεταλλάξεις L144R και L178P μειώνουν το ποσοστό ελικότητας της apoA-I και οδηγούν σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση αυτών των σωματιδίων κατά τη θερμική τους αποδιάταξη. Ωστόσο, οι διαταραχές που προκαλούν οι μεταλλάξεις L144R και L178P στη δομή της λιπιδιωμένης apoA-I είναι ηπιότερες, συγκρινόμενες με τις διαταραχές που προκαλούν οι ίδιες μεταλλάξεις στη δομική ακεραιότητα του μορίου της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I. Οι μεταβολές που επιφέρουν οι μεταλλάξεις L144R και L178P στη διαμόρφωση της λιπιδιωμένης apoA-I μπορεί να συνδέονται με τα μειωμένα επίπεδα HDL-C που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες αυτές τις μεταλλάξεις^[176-178]. Εν αντιθέσει, η μετάλλαξη A164S που δεν έχει σχετιστεί με χαμηλά επίπεδα HDL-C δεν επηρέασε το ποσοστό α-έλικας της apoA-I που περιέχεται σε rHDL σωματίδια και παρουσίασε διαφορετικό προφίλ θερμικής αποδιάταξης, σε σχέση με τις λιπιδιωμένες apoA-I[L144R] και apoA-I[L178P].

Είναι ευρέως γνωστό ότι η HDL ή το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της, η apoA-I, ασκούν ποικίλες βιολογικές δράσεις σε διάφορους τύπους κυττάρων, οι οποίες ενδεχομένως παρεμβαίνουν στις διαδικασίες και τους μηχανισμούς που οδηγούν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Σημαντικές αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της apoA-I/HDL αποτελούν, μεταξύ άλλων, η απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αγγείων, η επαγωγή μηχανισμών που συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου, καθώς και η αναστολή της οξειδωσης των λιπιδίων και κυρίως της LDL. Τα λειτουργικά πειράματα υποδεικνύουν ότι οι διαταραχές που επιφέρουν οι μεταλλάξεις L144R, A164S και L178P στη δομή της ελεύθερης λιπιδίων και λιπιδιωμένης apoA-I συνοδεύονται και από διαταραχές στις ιδιότητες της apoA-I/HDL.

Η λειτουργική ανάλυση για την apoA-I[L144R] έδειξε ότι η μετάλλαξη L144R δεν επηρεάζει την ικανότητα της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1. Επιπρόσθετα, η apoA-I[L144R] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια επιδεικνύει φυσιολογική και αντίστοιχη ικανότητα με τη λιπιδιωμένη apoA-I άγριου τύπου να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCG1, καθώς και φυσιολογική ικανότητα να επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει προταθεί ότι τα χαμηλά επίπεδα HDL-C που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες τη συγκεκριμένη μετάλλαξη πιθανόν να οφείλονται σε μειωμένη ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η έλικα 6 (αμινοξικά κατάλοιπα 143-164) της apoA-I, στην οποία εντοπίζεται το κατάλοιπο της Leu144, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT^[145-148,460]. Φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις της apoA-I στην περιοχή αυτή, όπως η Leu141Arg, η Leu159Arg και η Arg160Leu έχουν συνδεθεί με μειωμένη ικανότητα της apoA-I να ενεργοποιεί τα ένζυμο LCAT^[461-465]. Επιπλέον, μελέτες σε μύς που εξέφραζαν τη μετάλλαξη L144R, μέσω γονιδιακής μεταφοράς με τη χρήση αδενοϊού, έδειξαν ότι οι μύες αυτοί παρουσίαζαν πολύ χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης και μειωμένο λόγο εστέρων χοληστερόλης (CE) ως προς ολική χοληστερόλη (total cholesterol, TC), υποδεικνύοντας μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου LCAT^[177]. Ταυτόχρονη επιμόλυνση αυτών των μυών με αδενοϊό που έφερε το γονίδιο της ανθρώπινης LCAT οδήγησε σε αποκατάσταση των επιπέδων της χοληστερόλης και του λόγου CE/TC^[177]. Περαιτέρω, κινητικές μελέτες

καταδεικνύουν ότι ετεροζυγώτες ως προς την αποΑ-I[L144R] παρουσιάζουν αυξημένο καταβολικό ρυθμό της αποΑ-I κατά δύο φορές, σε σχέση με τον καταβολικό ρυθμό της αποΑ-I των ατόμων αναφοράς^[176]. Οι αλλαγές που διαπιστώθηκε ότι επιφέρει η μετάλλαξη L144R στη διαμόρφωση της λιπιδιωμένης αποΑ-I πιθανόν να επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I[L144R] με το ένζυμο LCAT, οι οποίες σε συνδυασμό με τον αυξημένο καταβολικό ρυθμό της αποΑ-I θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τα χαμηλά επίπεδα HDL-C που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες αυτή τη μετάλλαξη. Συνολικά, τα αποτελέσματα των λειτουργικών αναλύσεων της παρούσας μελέτης για την αποΑ-I[L144R], σε συνδυασμό με αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I[L144R] με το ένζυμο LCAT συνηγορούν στο γεγονός ότι η μετάλλαξη αυτή δε σχετίζεται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, αλλά μόνο με χαμηλά επίπεδα HDL-C.

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, η μετάλλαξη L178P έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα HDL-C. Τα λειτουργικά πειράματα υποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη L178P μειώνει σημαντικά την ικανότητα της αποΑ-I να οδηγεί σε εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774. Οι σοβαρότατες αλλαγές που προκαλεί η μετάλλαξη L178P στη δομική ακεραιότητα και σταθερότητα του μορίου της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I πιθανόν να διαταράσσουν τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τον ABCA1 και να οδηγούν σε μη αποτελεσματική λιπιδίωση της αποΑ-I. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα χαμηλά επίπεδα HDL-C που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες τη μετάλλαξη αυτή, καθώς οι αλληλεπιδράσεις της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-I ή ελάχιστα λιπιδιωμένης αποΑ-I με τον ABCA1 αποτελούν το πρώτο βήμα της πορείας βιογένεσης της HDL^[7,14]. Παράλληλα, η μειωμένη εκροή χοληστερόλης μέσω του μεταφορέα ABCA1 που παρουσιάζει η αποΑ-I[L178P] μπορεί να δικαιολογεί εν μέρει τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρόωρης στεφανιαίας νόσου, με τον οποίο έχει συσχετιστεί η μετάλλαξη L178P^[178]. Οι αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I με τον ABCA1 συμβάλλουν στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος, όπως υποδεικνύεται από μια πληθώρα μελετών^[244,466-469], εμποδίζοντας τον σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων, μια διαδικασία που αποτελεί εναρκτήριο βήμα της αθηρογένεσης^[180,470]. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας που εκπονήθηκαν από τον Δρ. Γεώργιο Δανιήλ έδειξαν ότι η HDL ετεροζυγων ατόμων ως προς τη μετάλλαξη L178P επιδεικνύει μειωμένη

αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση^[27]. Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένοι ετεροζυγώτες ως προς την αποΑ-I[L178P] χαρακτηρίζονται από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αύξηση του πάχους του καρωτιδικού τοιχώματος^[178]. Τα παραπάνω ευρήματα θα μπορούσαν επίσης να συμβάλλουν στην αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου.

Η λειτουργική ανάλυση εστιάστηκε κυρίως στη μετάλλαξη A164S, η οποία έχει χαρακτηριστεί από μια ιδιαίτερα μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη και αποτελεί τη μοναδική γνωστή μετάλλαξη στην αποΑ-I που ενώ σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας, εμφράγματος του μυοκαρδίου και αυξημένη θνησιμότητα, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, δεν επηρεάζει τα επίπεδα της HDL-C^[177]. Έχει υπονοηθεί ότι η μετάλλαξη αυτή μπορεί να σχετίζεται με την αμυλοείδωση. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν από το εργαστήριό μας και άλλους^[471] με τη χρήση της χρωστικής θειοφλαβίνης (Thioflavin T, ThT), η οποία ανιχνεύει τα β-αμυλοειδή, δεν έδειξαν καμία διαφορά μεταξύ της αποΑ-I άγριου τύπου και της αποΑ-I[A164S]. Τα πειράματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι η ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I[A164S] παρουσιάζει φυσιολογική ικανότητα να επάγει την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η αποΑ-I[A164S] οδηγεί στον σχηματισμό HDL σωματιδίων. Παρ' όλα αυτά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα αναδεικνύεται ότι τα rHDL σωματίδια που σχηματίζει η αποΑ-I[A164S] δεν είναι το ίδιο λειτουργικά με τα rHDL σωματίδια που σχηματίζει η αποΑ-I άγριου τύπου, αλλά και οι άλλες δύο μεταλλάξεις που μελετήθηκαν. Αναλυτικότερα, η μετάλλαξη A164S μειώνει την ικανότητα της αποΑ-I που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, τόσο σε αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά (EA.hy926), όσο και σε πρωτογενή καλλιέργεια (HCAEC). Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει προταθεί ως ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η HDL μπορεί να αναστείλει την έναρξη της αθηροσκλήρωσης^[215,472,473], καθώς η διατάραξη της ακεραιότητας του ενδοθηλίου αποτελεί χαρακτηριστικό των πρώτων σταδίων της αθηρογένεσης^[180,470]. Συνεπώς, η μειωμένη ικανότητα της λιπιδιωμένης αποΑ-I[A164S] να προάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων θα μπορούσε να δικαιολογήσει εν μέρει τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο με τον οποίο σχετίζεται η μετάλλαξη A164S. Περαιτέρω, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο μηχανισμός της μειωμένης ικανότητας της λιπιδιωμένης αποΑ-I[A164S] να επάγει

την επούλωση τραύματος διαπιστώθηκε ότι στη διαδικασία αυτή εμπλέκεται ο ενδοθηλιακός υποδοχέας LOX-1, ο οποίος ανέστειλε σε ένα βαθμό τη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt, που βρίσκεται καθοδικά της οδού σηματοδότησης που διεγείρεται από την επίδραση της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οδηγεί στον σχηματισμό ελασματοποδίων και τελικά στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων^[198,474]. Η ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού υποδοχέα LOX-1 πιθανότητα να οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων της MDA που παρατηρήθηκε κατόπιν επώασης των ενδοθηλιακών κυττάρων με rHDL-αποA-I[A164S]. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η μετάλλαξη A164S επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση των rHDL σωματιδίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της λιπιδιωμένης αποA-I[A164S] θα μπορούσε να συνδέεται με την αύξηση των προϊόντων οξείδωσης των λιπιδίων στα rHDL-αποA-I[A164S], αλλά και να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου των ατόμων που φέρουν τη μετάλλαξη A164S.

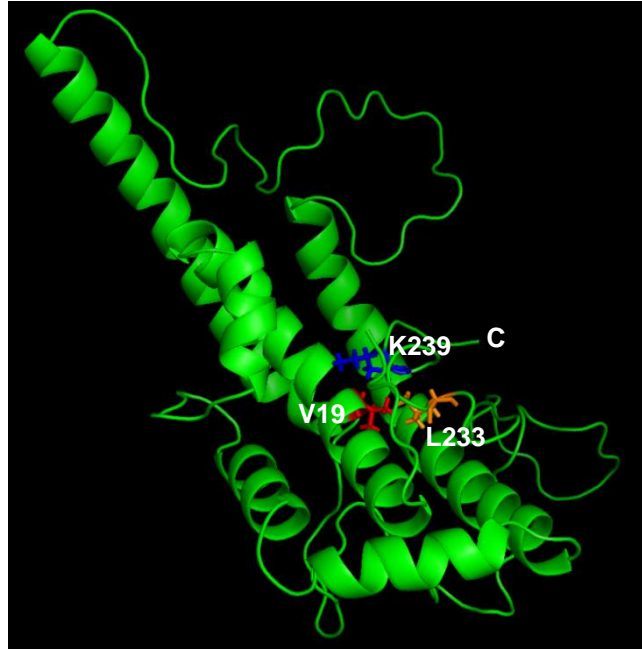
Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν την επίδραση των μεταλλάξεων L144R, A164S και L178P της αποA-I, που οδηγούν σε παθολογικούς φαινοτύπους, στη δομή, τη βιογένεση και τη λειτουργικότητα της HDL και θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τα χαμηλά επίπεδα HDL-C, καθώς και τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο που έχει παρατηρηθεί στα άτομα που φέρουν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Επιπλέον, η μελέτη αυτή αναδεικνύει ότι η υποκατάσταση ενός και μόνο αμινοξέος στην αποA-I μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές της δομής της αποA-I που μπορεί να σχετίζονται με διαφοροποιήσεις στη λειτουργικότητα, αλλά και τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της αποA-I/HDL.

5.4 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας της φυσικά απαντώμενης σημειακής μετάλλαξης V19L της αποA-I που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HDL-C και με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου

Την τελευταία δεκαετία η αποA-I έχει αποτελέσει έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για τη μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων και έχουν αναπτυχθεί αρκετές φαρμακολογικές προσεγγίσεις που μιμούνται τη λειτουργία, αλλά και τη δομή της αποA-I. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά^[289,292,293,475,476]. Υπό το πρίσμα αυτών των δεδομένων, στην

παρούσα διατριβή μελετήθηκε μια νέα φυσικά απαντώμενη σημειακή μετάλλαξη στην apoA-I, η Val19Leu, η οποία εντοπίστηκε με μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide association study, GWAS) στον ισλανδικό πληθυσμό και συσχετίστηκε με αύξηση των επιπέδων της HDL-C κατά 0,26 mmol/L, καθώς και με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου κατά 26%^[179]. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση της μετάλλαξης V19L στη δομή της ελεύθερης λιπιδίων και λιπιδιωμένης apoA-I με μια σειρά βιοφυσικών τεχνικών, καθώς και η επίδραση αυτής στις λειτουργίες της apoA-I και της HDL. Η σημειακή μετάλλαξη V19L εντοπίζεται στην αρχή του αμινο-τελικού άκρου της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην έλικα 1 (αμινοξικά κατάλοιπα 8-35)^[85]. Έχει προταθεί ότι το αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και ιδιαίτερα τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-43 σταθεροποιούν τη διαμόρφωση της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I^[85,87]. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι μεταλλάξεις στην αμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης επηρεάζουν τη διαμόρφωση και τις λειτουργίες της ελεύθερης λιπιδίων και λιπιδιωμένης apoA-I^[90,401,477-480]. Η κατανόηση της σχέσης της δομής της apoA-I με τη λειτουργικότητα της apoA-I και της HDL είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς η apoA-I αποτελεί έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για τη μείωση των αθηροκληρωτικών καρδιαγγειακών επεισοδίων.

Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων ανθρώπινης apoA-I^[85], το κατάλοιπο της βαλίνης στη θέση 19 της αμινοξικής αλληλουχίας της apoA-I (Val19) βρίσκεται σε εγγύτητα με τα κατάλοιπα της λευκίνης στη θέση 233 της αμινοξικής αλληλουχίας της apoA-I (Leu233) και της λυσίνης (Lys239) στη θέση 239 της αμινοξικής αλληλουχίας της apoA-I που εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Εικόνα 5.1). Η μεταλλαγή του καταλοίπου της βαλίνης σε λευκίνη, που είναι ένα πιο ογκώδες αμινοξύ, μπορεί να επηρεάζει την τοποθέτηση και τον προσανατολισμό των ανωτέρω καταλοίπων και ως εκ τούτου τη διαμόρφωση των δύο δομικών περιοχών της apoA-I και τη συνολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 5.1. Αναπαράσταση του μοντέλου της πλήρους μήκους ελεύθερης λιπιδίων ανθρώπινης apoA-I, που αναδεικνύει τη θέση που εντοπίζονται τα κατάλοιπα της βαλίνης, της λευκίνης και της λυσίνης. V: βαλίνη, L: λευκίνη, K: λυσίνη (τροποποιημένη εικόνα από [85]).

Η βιοφυσική ανάλυση της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I[V19L] καταδεικνύει ότι η εισαγωγή της μετάλλαξης επηρεάζει την τοπική δευτεροταγή δομή της apoA-I, μειώνοντας το περιεχόμενο ποσοστό α-έλικας στα 208 nm, οδηγεί σε θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της θερμικής και χημικής αποδιάταξης, καθώς και στην έκθεση μεγαλύτερου ποσοστού υδρόφοβων περιοχών αυτής στον διαλύτη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη V19L επηρεάζει τη συνολική αναδίπλωση του μορίου της apoA-I και οδηγεί σε μια λιγότερο συμπαγή τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η παρατήρηση αυτή ενισχύθηκε από τη δοκιμασία κινητικής αναμόρφωσης κυστιδίων DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, διμυριστόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη), η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της ικανότητας των απολιποπρωτεϊνών να προσδένουν λιπίδια^[449,481,482]. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν από τη Δρ. Αγγελική Μπουρτσάλα στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη apoA-I διαυγάει το αιώρημα DMPC κυστιδίων με ταχύτερη κινητική, σε σχέση με την apoA-I άγριου τύπου, υποδεικνύοντας αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης λιπιδίων για την apoA-I[V19L]. Έχει προταθεί ότι η πρόσδεση των λιπιδίων λαμβάνει χώρα αρχικά μέσω του καρβοξυ-τελικού άκρου της apoA-I και ακολουθείται από τη διαμορφωτική αναδιοργάνωση του δεματίου

α-ελίκων της αμινο-τελικής περιοχής της πρωτεΐνης^[87,483-485]. Η μετάλλαξη V19L φαίνεται να επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις του αμινο- και καρβοξυ-τελικού άκρου της πρωτεΐνης, αυξάνοντας την ευελιξία του δεματίου α-ελίκων της αμινο-τελικής περιοχής. Η αυξημένη ευελιξία του δεματίου α-ελίκων της αμινο-τελικής περιοχής της αποΑ-I[V19L] είναι πιθανό να διευκολύνει την πρόσδεση των λιπιδίων.

Από τη βιοφυσική ανάλυση των rHDL σωματιδίων διαπιστώθηκε ότι η λιπιδιωμένη αποΑ-I[V19L] είναι ελαφρά πιο σταθεροποιημένη, καθώς παρουσίασε υψηλότερη κατά ~2 °C θερμοκρασία τήξης ($T_{1/2}$) στο μέσο της μετάβασης της θερμικής αποδιάταξης, σε σχέση με τη λιπιδιωμένη αποΑ-I άγριου τύπου. Η αυξημένη θερμοδυναμική σταθεροποίηση πιθανόν να οφείλεται στο μεγαλύτερο μέγεθος των υποπληθυσμών των rHDL σωματιδίων που σχημάτισε η αποΑ-I[V19L], όπως εκτιμήθηκε από την ηλεκτροφόρηση αυτών των rHDL σωματιδίων σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε πως στα rHDL σωματίδια η αποΑ-I[V19L] ανέκτησε τη δευτεροταγή δομή της, καθώς παρουσίασε αντίστοιχο ποσοστό α-έλικας με τη λιπιδιωμένη αποΑ-I άγριου τύπου. Η αύξηση της α-ελικότητας που παρατηρείται γενικά κατά τη λιπιδίωση της αποΑ-I αποδίδεται κυρίως στην αναδιοργάνωση του καρβοξυ-τελικού άκρου της πρωτεΐνης, που θεωρείται ότι σχηματίζει δομές α-έλικας. Είναι αποδεκτό ότι η λιπιδίωση και ο σχηματισμός HDL σωματιδίων σταθεροποιούν τη δομή της αποΑ-I^[72,78,87].

Η βιογένεση της HDL είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και περιλαμβάνει τη συμμετοχή αρκετών μεμβρανικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών του πλάσματος^[14]. Η ελεύθερη λιπιδίων αποΑ-I[V19L] παρουσίασε φυσιολογική και αντίστοιχη ικανότητα με την αποΑ-I άγριου τύπου *in vitro* να επάγει την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα μυός J774, μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ABCA1. Περαιτέρω, η λιπιδιωμένη αποΑ-I[V19L] επέδειξε παρόμοια ικανότητα με την αποΑ-I άγριου τύπου που περιέχεται σε rHDL σωματίδια να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT. Συνεπώς, τα πειράματα υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα HDL-C που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες τη μετάλλαξη V19L δεν οφείλονται σε διαταραχές της πορείας βιογένεσης της HDL, τα πρώτα βήματα της οποίας αποτελούν η λιπιδίωση της αποΑ-I μέσω του ABCA1 και ο σχηματισμός σφαιρικών HDL σωματιδίων μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από τη λιπιδιωμένη αποΑ-I.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η HDL, μετά τον σχηματισμό της, μπορεί να αναδιοργανωθεί μέσω των αλληλεπιδράσεων της με διάφορους κυτταρικούς

υποδοχείς και πρωτεΐνες του πλάσματος^[14]. Η HDL μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1, ο οποίος προάγει την εκροή κυτταρικής χοληστερόλης προς την HDL^[15,16]. Επιπλέον, η ώριμη HDL μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα της SR-BI, ο οποίος επάγει την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από την HDL προς τα κύτταρα, καθώς επίσης διευκολύνει την αμφίδρομη ροή της ελεύθερης χοληστερόλης μεταξύ των κυττάρων και της HDL^[7,486]. Έχει δειχθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις της HDL με τον SR-BI είναι υπεύθυνες για την κινητοποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης από ολόκληρο το σώμα^[487-489]. Μελέτες σε διαγονιδιακούς μυς που υπερεκφράζουν τον SR-BI^[490,491] ή σε μυς που έχουν ανεπάρκεια του SR-BI^[492,93] υποδεικνύουν ότι ο SR-BI είναι ο κύριος ρυθμιστής των επιπέδων της HDL-C του πλάσματος.

Τα λειτουργικά πειράματα έδειξαν ότι η αποA-I[V19L] που περιέχεται σε rHDL σωματίδια έχει φυσιολογική ικανότητα να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του ABCG1, αλλά επιδεικνύει αυξημένη ικανότητα κατά 45% να προάγει την εξαρτώμενη από τον SR-BI εκροή χοληστερόλης, από κύτταρα HEK293, σε σχέση με τη λιπιδιωμένη αποA-I άγριου τύπου. Η αύξηση αυτή μπορεί να σχετίζεται με το μέγεθος των υποπληθυσμών των rHDL σωματιδίων που σχημάτισε η αποA-I[V19L]. Έχει δειχθεί ότι τα μεγαλύτερα σε μέγεθος HDL σωματίδια, που είναι πλούσια σε λιπίδια, επάγουν περισσότερο την εκροή χοληστερόλης μέσω του SR-BI, σε σχέση με τα μικρότερα, επειδή δεσμεύονται ισχυρότερα στον υποδοχέα SR-BI^[494]. Επιπλέον, μια μελέτη έδειξε ότι η HDL που απομονώθηκε από το πλάσμα υγιών γυναικών παρουσίασε αυξημένη ικανότητα να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του SR-BI, σε σχέση με την HDL που απομονώθηκε από το πλάσμα υγιών ανδρών. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε στα στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα πλάσματος των μεγάλων σε μέγεθος, πλούσιων σε λιπίδια HDL2 σωματιδίων που παρατηρήθηκαν στον γυναικείο πληθυσμό που εξετάστηκε^[495].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αυξημένη ικανότητα της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I[V19L] να προσδένει λιπίδια, σε συνδυασμό με την αυξημένη θερμοδυναμική σταθερότητα των HDL σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I[V19L], καθώς και η αυξημένη ικανότητα αυτών των σωματιδίων να δέχονται επιπρόσθετη χοληστερόλη μέσω του SR-BI θα μπορούσε να δικαιολογήσει τα αυξημένα επίπεδα HDL-C, που έχουν παρατηρηθεί στους φέροντες τη μετάλλαξη V19L. Επιπρόσθετα, η αυξημένη ικανότητα της

λιπιδιωμένης αποΑ-I[V19L] να επάγει την εκροή χοληστερόλης μέσω του SR-BI θα μπορούσε να υποστηρίξει το αθηροπροστατευτικό δυναμικό της αποΑ-I[V19L], καθώς έχει προταθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις της HDL με τον SR-BI συμβάλλουν στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος, μέσω της πορείας ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης^[20,195,496,497].

Η μελέτη αυτή, εξ όσων είναι γνωστά, είναι η πρώτη που αξιολογεί την επίδραση της φυσικά απαντώμενης σημειακής μετάλλαξης της αποΑ-I, V19L, στη δομή και τις λειτουργίες της ελεύθερης λιπιδίων και λιπιδιωμένης αποΑ-I. Συνολικά, τα ευρήματα που προέκυψαν στην παρούσα διατριβή από τη μελέτη φυσικά απαντώμενων σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο της ανθρώπινης αποΑ-I θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην κατανόηση της σχέσης της δομής της αποΑ-I με τις λειτουργίες της αποΑ-I/HDL, καθώς και στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου σε άτομα με διαταραγμένο μεταβολισμό της HDL. Επιπρόσθετα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αύξηση των επιπέδων της HDL, καθώς και τη μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 1. Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Adenovirus-insect cell system	Σύστημα έκφρασης αδενοϊού-κυττάρων εντόμου
Bamboo spine	Αγκύλωση
Bilayer	Διπλοστιβάδα
Chinese hamster ovary cell system	Σύστημα έκφρασης κυττάρων ωοθηκών κινεζικού χάμστερ
Competent cells	Επιδεκτικά κύτταρα
Consensus model	Συναινετικό μοντέλο
Cross-linking methods	Μέθοδοι διασύνδεσης
Degranulation	Αποκοκκίωση
Double belt	Διπλή ζώνη
Fatty streak lesions	Λιπαρές ραβδώσεις
Foam cells	Αφρώδη κύτταρα
Force field	Πεδίο δυνάμεων
Holoparticle uptake	Ενδοκύττωση ολόκληρου του σωματιδίου
Inclusion bodies	Σωματίδια εγκλεισμού
Lamellipodia	Ελασματοπόδια
Lid region	Περιοχή επικάλυψης
Lipid rafts	Σχεδίες λιπιδίων
Molecular dynamics simulations	Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής
Molten globule	Τηγμένη σφαιρική
Periodic Boundary Conditions	Περιοδικές Οριακές Συνθήκες
Scavenger	Εκκαθαριστής
Tangier disease	Νόσος της Τανγκέρης
Transformation	Μετασχηματισμός
Trefoil	Τριφύλλι
Walker A, B, C	Περιπατητής A, B, C
Wound healing assay	Δοκιμασία προσομοίωσης επούλωσης πληγών

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

Σύντμηση	Ελληνικός όρος	Ξενόγλωσσος όρος
αα	Αμινοξέα	Amino acids
ABCA1	Μεταφορέας με κασέτα δέσμευσης ATP A1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	Μεταφορέας με κασέτα δέσμευσης ATP G1	ATP-binding cassette transporter G1
ACS	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	Acute coronary syndrome
Akt	Πρωτεϊνική κινάση B	Protein kinase B
Ala (A)	Αλανίνη	Alanine
ANS	1-ανιλίνο-ναφθαλενο-8-σουλφονικό οξύ	1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid
απο	Απολιποπρωτεΐνη	Apolipoprotein
αποA-I	Απολιποπρωτεΐνη A-I	Apolipoprotein A-I
αποB-48	Απολιποπρωτεΐνη B-48	Apolipoprotein B-48
αποE	Απολιποπρωτεΐνη E	Apolipoprotein E
Arg (R)	Αργινίνη	Arginine
ΑΣ	Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα	Ankylosing spondylitis
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη	Adenosine triphosphate
BAECs	Ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοοειδών	Bovine aorta endothelial cells
BASDAI	Δείκτης Δραστηριότητας ΑΣ	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
bp	Ζεύγη βάσεων	Base pairs
BMI	Δείκτης μάζας σώματος	Body mass index
BMP-1	Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-1	Bone morphogenetic protein-1
BSA	Αλβουμίνη ορού βοός	Bovine serum albumin
CAD	Στεφανιαία νόσος	Coronary artery disease
CD	Κυκλικός διχρωϊσμός	Circular dichroism
CE	Εστέρες χοληστερόλης	Cholesteryl esters
CETP	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης	Cholesteryl ester transfer protein
CM	Χυλομικρά	Chylomicrons
Cox-2	Κυκλοοξυγενάση-2	Cyclooxygenase-2

CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	C-reactive protein
CVD	Καρδιαγγειακή νόσος	Cardiovascular disease
DCF	2',7'-Διχλωροφλουορεσκεΐνη	2',7'-Dichlorofluorescein
DCFH	2',7'-Διχλωροδιϋδροφλουορεσκεΐνη	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
DMARD	Τροποποιητικά της νόσου αντιρρευματικά φάρμακα	Disease-modifying antirheumatic drugs
DMEM	Θρεπτικό μέσο κυτταρικών καλλιιεργειών	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPC	Διμυριστούλο-φωσφατιδυλοχολίνη	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Διάλυμα φωσφορικών αλάτων	Dulbecco's phosphate buffered saline
dsDNA	Δίκλωνο DNA	Double stranded DNA
DTT	Διθειοθρεϊτόλη	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	Εσερίχια κόλι	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ	Ethylenediaminetetraacetic acid
EL	Ενδοθηλιακή λιπάση	Endothelial lipase
eNOS	Ενδοθηλιακή συνθάση του NO	Endothelial nitric oxide synthase
FBS	Ορός εμβρύου βοός	Fetal Bovine Serum
FC	Ελεύθερη χοληστερόλη	Free cholesterol
FED	Νόσος «μάτι του ψαριού»	Fish-eye disease
FLD	Οικογενής έλλειψη της LCAT	Familial LCAT deficiency
FXR	Υποδοχέας X φαρνεσοειδών	Farnesoid X receptor
Gln (Q)	Γλουταμίνη	Glutamine
Glu (E)	Γλουταμινικό οξύ	Glutamic acid
Gly (G)	Γλυκίνη	Glycine
GSHPx	Σεληνοπεροξειδάση της γλουταθειόνης	Selenium-glutathione peroxidase
GWAS	Μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος	Genome-wide association study
H	Έλικα	Helix
HCAEC	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα στεφανιαίας αρτηρίας	Human coronary artery endothelial cells
H ₂ DCFDA	Διοξικός εστέρας της 2',7'-διχλωρο-διϋδρο-φλουορεσκεΐνης	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη	High density lipoprotein

HDL-C	HDL-χοληστερόλη	HDL-cholesterol
HDX-MS	Ισοτοπική ανταλλαγή υδρογόνου-δευτερίου	Hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry
HEK293	Εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού ανθρώπου σειρά HEK293	Human embryonic kidney 293 cells
HL	Ηπατική λιπάση	Hepatic lipase
HLA-B27	Αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης I	Human leucocyte antigen-B27
HNF-4	Πυρηνικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων -4	Hepatocyte nuclear factor-4
HREs	Στοιχεία απόκρισης ορμονών	Hormone response elements
HUVECs	Ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας ανθρώπου	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1	Intercellular adhesion molecule 1
IPTG	Ισοπροπυλο β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IDL	Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη	Intermediate density lipoprotein
IMT	Πάχος του έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων αρτηριών	Intima-media thickness
KAN	Καρδιαγγειακή νοσος	Cardiovascular disease
LB	Θρεπτικό μέσο βακτηριακών καλλιεργείων	Luria-Bertani media
LCAT	Ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης	Lecithin: cholesterol acyl transferase
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη	Low density lipoprotein
LDLr	Υποδοχέας της LDL	LDL receptor
Leu (L)	Λευκίνη	Leukine
LOOH	Υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων	Lipid hydroperoxides
LOX-1	Ενδοθηλιακός υποδοχέας οξειδωμένων λιπιδίων	Lectin-type oxidized LDL receptor 1
LPL	Λιποπρωτεϊνική λιπάση	Lipoprotein lipase
LXR	Υποδοχέας X ήπατος	Liver X receptor
Lys (K)	Λυσίνη	Lysine
lysoPC	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	Lysophosphatidylcholine
MAPK	Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1	Monocyte chemotactic protein 1

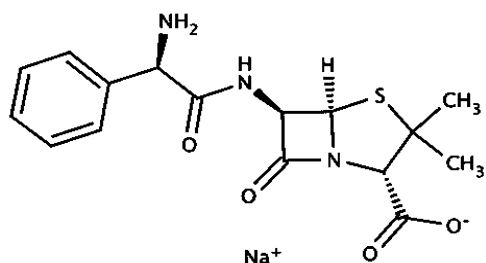
M-CSF	Διεγερτικός παράγοντας των αποικιών των μακροφάγων	Monocyte-colony stimulating factor M-CSF
MDA	Μηλονική διαλδεΰδη	Malondialdehyde
Met (M)	Μεθειονίνη	Methionine
MI	Εμφραγμα του μυοκαρδίου	Myocardial infraction
MMPs	Μεταλλοπρωτεϊνάσες	Matrix metalloproteinases
MPO	Μυελοϋπεροξειδάση	Myeloperoxidase
NBD	Περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου	Nucleotide Binding Domain
NF	Πυρηνικοί παράγοντες	Nuclear factors
NK	Φυσικά κύτταρα «φονιάς»	Natural killers cells
NO	Μονοξείδιο του αζώτου	Nitric oxide
oxLDL	Οξειδωμένη LDL	Oxidized LDL
oxPL	Οξειδωμένα φωσφολιπίδια	Oxidized phospholipids
PAF-AH	Ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων	Platelet-activating factor acetyl hydrolase
PDZK1	Πρωτεΐνη προσαρμογέας	PDZ domain containing 1
PG ₁₂	Προσταγλανδίνη I ₂	Prostaglandin I ₂
Phe (F)	Φαινυλαλανίνη	Phenylalanine
PI3K	Κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Πρωτεϊνική κινάση A	Protein kinase A
PL	Φωσφολιπίδια	Phospholipids
PLA ₂	Φωσφολιπάση A ₂	Phospholipase A ₂
PLTP	Πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων	Phospholipid transfer protein
PON1	Παραοξονάση 1	Paraoxonase 1
POPC	2-Ολεϋλο-1-παλμιτοϋλο- <i>sn</i> -γλυκερο-3-φωσφοχολίνη	2-Oleoyl-1-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PPAR α	Υποδοχέας που ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων	Peroxisome proliferator-activated receptor α
Pro (P)	Προλίνη	Proline
RA	Ρευματοειδής αρθρίτιδα	Rheumatoid arthritis
RCT	Ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης	Reverse cholesterol transport
rHDL	Δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL	Reconstituted HDL
RMSD	Ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης	Root-mean-square deviation

RMSF	Ρίζα της μέσης τετραγωνικής διακύμανσης των ατομικών θέσεων	Root-mean-square fluctuation
ROS	Δραστικές οξυγονούχες ενώσεις	Reactive oxygen species
RXRα	Υποδοχέας X ρετινοειδών	Retinoid X receptor
SAA	Αμυλοειδές Α του ορού	Serum amyloid A
SDS	Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο	Sodium Dodecyl Sulfate
ΣΕΛ	Ερυθηματώδης λύκος	Lupus erythematosus
Sp1	Πρωτεΐνη εξειδίκευσης 1	Specificity protein 1
S1PRs	Υποδοχείς της 1-φωσφορικής σφινγοσίνης	Sphingosine-1-phosphate receptors
SRA-I	Υποδοχέας εκκαθαριστής τάξη Α τύπος Ι	Scavenger receptor class A type I
SR-BI	Υποδοχέας εκκαθαριστής τάξη Β τύπος Ι	Scavenger receptor class B type I
Src	Κινάση του σαρκώματος	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
Ser (S)	Σερίνη	Serine
TG	Τριγλυκερίδια	Triglycerides
TGF ₂	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β ₂	Transforming growth factor β ₂
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α	Anti-tumor necrosis factor-α
Trp (W)	Θρυπτοφάνη	Tryptophan
Trx	Θειορεδοξίνη	Thioredoxin
Tyr (Y)	Τυροσίνη	Tyrosine
UA	Ασταθή στηθάγχη	Unstable angina
Val (V)	Βαλίνη	Valine
VCAM-1	Μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη	Very low density lipoprotein
wt	Άγριος τύπος	Wild type

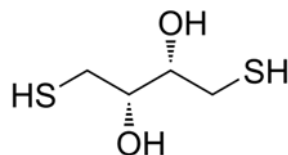
Η μετάφραση των επιστημονικών όρων έγινε σύμφωνα με τα εξής λεξικά: Αγγλοελληνικό Λεξικό Βιολογικών και Ιατρικών Όρων (Έκδοση 1992), Αγγλοελληνικό Λεξικό Βιοχημείας, Μοριακής βιολογίας και Βιοτεχνολογίας της ΕΕΒΜΒ (Έκδοση 1995) και Αγγλοελληνικό Λεξικό Χημικών και Συγγενών με τη Χημεία Όρων (Έκδοση 1998).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

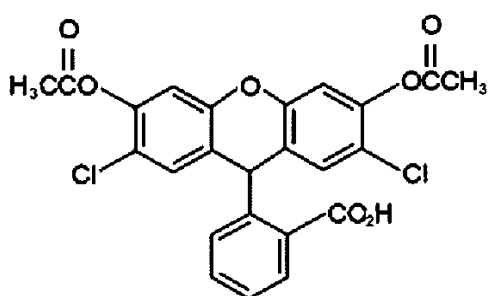
Δομές Οργανικών Ενώσεων



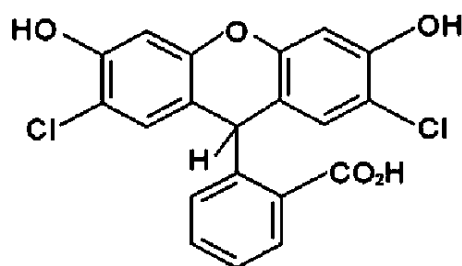
Αμπικιλίνη (Ampicillin)



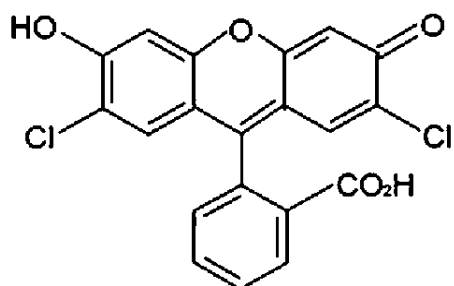
Διθειοθρεϊτόλη
(Dithiothreitol, DTT)



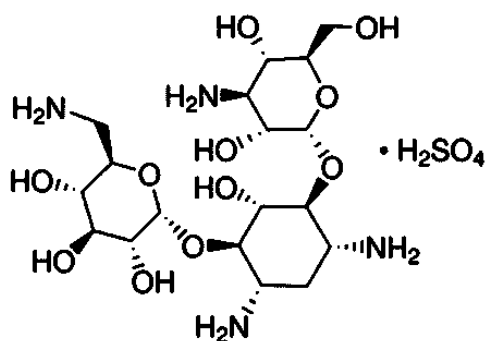
Διοξικός εστέρας της 2',7'-διχλωρο-διϋδρο-
φλουρεσκείνης (2',7'-Dichlorofluorescein
diacetate, H₂DCFDA)



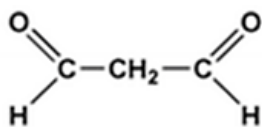
2',7'-Διχλωροδιϋδροφλουρεσκίνης
(2',7'-Dichlodihydrofluorescein DCFH)



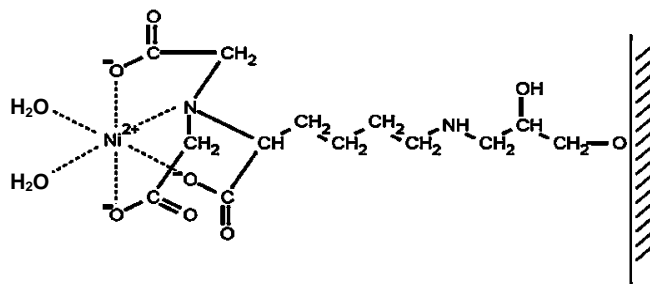
2',7'-Διχλωροφλουρεσκείνη (2',7'-
Dichlorofluorescein DCFH)



Καναμικίνη (Kanamycin)



Μηλονική διαλδεϋδη
(Malondialdehyde,
MDA)



Διάλυμα ρητίνης νικελίου-νιτριλοτριοξικού
οξέος (Ni²⁺-nitrilotriacetic acid, Ni²⁺-NTA)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zannis V.I., Cardot P., Cladaras C., Zanni E.E., Chambaz J., Talianidis Y., Kardassis D., Genetics mutations affecting human lipoproteins, their receptors and their enzymes. *In: Liver Gene Expression CRC Press FL*, 1994, 63-82.
2. Havel J.H. and Kane J.P., Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. *In: The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, (Eds. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D.), New York: McGraw-Hill, 2001, 2705-16.*
3. Zannis V.I., Kypreos K.E., Chroni A., Kardassis D., Zanni E.E., Lipoproteins and atherogenesis. *In: Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, (Ed. Loscalzo J), Abington, UK: Taylor & Francis, 2004, 111-74.*
4. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C. Jr., Weisgraber K.H., Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*, 1984, 25: 1277-94.
5. Hussain M.M., Kancha R.K., Zhou Z., Luchoomun J., Zu H., Bakillah A., Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1300: 151-70.
6. Shelness G.S. and Sellers J.A., Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol*, 2001, 12: 151-7.
7. Zannis V.I., Chroni A., Krieger M., Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med*, 2006, 84: 276-94.
8. Hussain M.M., A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*, 2000, 148: 1-15.
9. Zannis V.I., Chroni A., Kypreos K.E., Kan H.Y., Cesar T.B., Zanni E.E., Kardassis D., Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer. *Curr Opin Lipidol*, 2004, 15: 151-66.
10. Blasiolo D.A., Davis R.A., Attie A.D., The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol Biosyst*, 2007, 3: 608-19.
11. Zannis V.I., Cole F.S., Jackson C.L., Kurnit D.M., Karathanasis S.K., Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry*, 1985, 24: 4450-5.

12. Rader D.J., Alexander E.T., Weibel G.L., Billheimer J., Rothblat G.H., The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*, 2009, 50 Suppl: S189-S194.
13. Barter P., Gotto A.M., LaRosa J.C., Maroni J., Szarek M., Grundy S.M., Kastelein J.J., Bittner V., Fruchart J.C., HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol and cardiovascular events. *N Engl J Med*, 2007, 357: 1301-10.
14. Zannis V.I., Fotakis P., Koukos G., Kardassis D., Ehnholm C., Jauhiainen M., Chroni A., HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 224: 53-111.
15. Nakamura K., Kennedy M.A., Baldan A., Bojanic D.D., Lyons K., Edwards P.A., 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*, 2004, 279: 45980-9.
16. Vaughan A.M. and Oram J.F., ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem*, 2005, 280: 30150-7.
17. Albers J.J. and Cheung M.C., Emerging roles for phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 2004,15: 255-60.
18. Fielding C.J., From Basic Biology to Clinical Aspects, 2007.
19. Vikstedt R., Metso J., Hakala J., Olkkonen V.M., Ehnholm C., Jauhiainen M., Cholesterol efflux from macrophage foam cells is enhanced by active phospholipid transfer protein through generation of two types of acceptor particles. *Biochemistry*, 2007, 46: 11979-86.
20. Hoekstra M., SR-BI as target in atherosclerosis and cardiovascular disease - A comprehensive appraisal of the cellular functions of SR-BI in physiology and disease. *Atherosclerosis*, 2017, 258: 153-61.
21. Barter P.J., Brewer H.B. Jr., Chapman M.J., Hennekens C.H., Rader D.J., Tall A.R., Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 160-7.
22. Santamarina-Fojo S., Gonzalez-Navarro H., Freeman L., Wagner E., Nong Z., Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 1750-4.

23. Maugeais C., Tietge U.J., Broedl U.C., Marchadier D., Cain W., McCoy M.G., Lund-Katz S., Glick J.M., Rader D.J., Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation*, 2003, 108: 2121-6.
24. Brunzell J.D., Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. *In: The Metabolic Basis of Inherited Disease*, (Eds. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., and Valle D.), New York: McGraw-Hill, 1989, 1165-80.
25. Martinez L.O., Jacquet S., Esteve J.P., Rolland C., Cabezon E., Champagne E., Pineau T., Georgeaud V., Walker J.E., Terce F., Collet X., Perret B., Barbaras R., Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 2003, 421: 75-9.
26. Chroni A. and Kardassis D., HDL dysfunction caused by mutations in apoA-I and other genes that are critical for HDL biogenesis and remodeling. *Curr Med Chem*, 2018, 25: 1-32.
27. Daniil G., Phedonos A.A., Holleboom A.G., Motazacker M.M., Argyri L., Kuivenhoven J.A., Chroni A., Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apoA-I-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders. *Clin Chim Acta*, 2011, 412: 1213-20.
28. Rosenson R.S., Brewer H.B. Jr., Chapman M.J., Fazio S., Hussain M.M., Kontush A., Krauss R.M., Otvos J.D., Remaley A.T., Schaefer E.J., HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*, 2011, 57: 392-410.
29. Camont L., Chapman M.J., Kontush A., Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*, 2011, 17: 594-603.
30. Rye K.A., Bursill C.A., Lambert G., Tabet F., Barter P.J., The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res*, 2009, 50 Suppl: S195-S200.
31. Kontush A., Lindahl M., Lhomme M., Calabresi L., Chapman M.J., Davidson W.S., Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 224: 3-51.
32. Cheung M.C. and Albers J.J., Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem*, 1984, 259: 12201-9.

33. Cheung M.C. and Albers J.J., Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *J Lipid Res*, 1982, 23: 747-53.
34. Duriez P. and Fruchart J.C., High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I. *Clin Chim Acta*, 1999, 286: 97-114.
35. De Lalla O.F. and Gofman J.W., Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Methods Biochem Anal*, 1954, 1: 459-78.
36. Anderson D.W., Nichols A.V., Forte T.M., Lindgren F.T., Particle distribution of human serum high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 493: 55-68.
37. Castro G.R. and Fielding C.J., Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry*, 1988, 27: 25-9.
38. Asztalos B.F., Sloop C.H., Wong .L, Roheim P.S., Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1169: 291-300.
39. Fielding C.J. and Fielding P.E., Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 1995, 36: 211-28.
40. Asztalos B.F., Roheim P.S., Milani R.L., Lefevre M., McNamara J.R., Horvath K.V., Schaefer E.J., Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 2670-6.
41. Asztalos B.F., Collins D., Cupples L.A., Demissie S., Horvath K.V., Bloomfield H.E., Robins S.J., Schaefer E.J., Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 2185-91.
42. Asztalos B.F., Horvath K.V., Kajinami K., Nartsupha C., Cox C.E., Batista M., Schaefer E.J., Inazu A., Mabuchi H., Apolipoprotein composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Lipid Res*, 2004, 45: 448-55.
43. Sorci-Thomas M.G. and Thomas M.J., The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12: 121-8.
44. von Eckardstein A., Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes. *Atherosclerosis*, 2006, 186: 231-9.

45. Strang A.C., Hovingh G.K., Stroes E.S., Kastelein J.J., The genetics of high-density lipoprotein metabolism: clinical relevance for therapeutic approaches. *Am J Cardiol*, 2009, 104: 22E-31E.
46. Plump A.S., Scott C.J., Breslow J.L., Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:9607-11.
47. Rubin E.M., Krauss R.M., Spangler E.A., Verstuyft J.G., Clift S.M., Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*, 1991, 353: 265-7.
48. Benoit P., Emmanuel F., Caillaud J.M., Bassinet L., Castro G., Gallix P., Fruchart J.C., Branellec D., Deneffe P., Duverger N., Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation*, 1999, 99: 105-10.
49. Duverger N., Kruth H., Emmanuel F., Caillaud J.M., Viglietta C., Castro G., Tailleux A., Fievet C., Fruchart J.C., Houdebine L.M., Deneffe P., Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation*, 1996, 94: 713-7.
50. Zannis V.I., Karathanasis S.K., Keutmann H.T., Goldberger G., Breslow J.L., Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 2574-8.
51. Bruns G.A., Karathanasis S.K., Breslow J.L., Human apolipoprotein A-I-C-III gene complex is located on chromosome 11. *Arteriosclerosis*, 1984, 4: 97-102.
52. Cheung P., Kao F.T., Law M.L., Jones C., Puck T.T., Chan L., Localization of the structural gene for human apolipoprotein A-I on the long arm of human chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 508-11.
53. Karathanasis S.K., Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, and AIV genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 6374-8.
54. Zannis V.I., Kan H.Y., Kritis A., Zanni E., Kardassis D., Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Front Biosci*, 2001, 6: D456-D504.

55. Tzamelis I. and Zannis V.I., Binding specificity and modulation of the ApoA-I promoter activity by homo- and heterodimers of nuclear receptors. *J Biol Chem*, 1996, 271: 8402-15.
56. Hu Y., Ren X., Wang H., Ma Y., Wang L., Shen Y., Oka K., Zhang Z., Zhang Y., Liver-specific expression of an exogenous gene controlled by human apolipoprotein A-I promoter. *Int J Pharm*, 2010, 398: 161-4.
57. Haas M.J. and Mooradian A.D., Therapeutic interventions to enhance apolipoprotein A-I-mediated cardioprotection. *Drugs*, 2010, 70: 805-21.
58. Li J., Ning G., Duncan S.A., Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev*, 2000, 14: 464-74.
59. Staels B. and Auwerx J., Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. *Atherosclerosis*, 1998, 137 Suppl: S19-S23.
60. Delerive P., Galardi C.M., Bisi J.E., Nicodeme E., Goodwin B., Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI gene transcription. *Mol Endocrinol*, 2004, 18: 2378-87.
61. Huuskonen J., Vishnu M., Chau P., Fielding P.E., Fielding C.J., Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells. *Biochemistry*, 2006, 45: 15068-74.
62. Kardassis D., Tzamelis I., Hadzopoulou-Cladaras M., Talianidis I., Zannis V.I., Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer for proximal promoters that contain hormone response elements. Synergism between hepatic nuclear factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 222-32.
63. Lavrentiadou S.N., Hadzopoulou-Cladaras M., Kardassis D., Zannis V.I., Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors. *Biochemistry*, 1999, 38: 964-75.
64. Kardassis D., Gafencu A., Zannis V.I., Davalos A., Regulation of HDL genes: transcriptional, posttranscriptional, and posttranslational. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 224: 113-79.
65. Karathanasis S.K., Zannis V.I., Breslow J.L., Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 6147-51.

66. Zhu J., Gardner J., Pullinger C.R., Kane J.P., Thompson J.F., Francone O.L., Regulation of apoA1 processing by procollagen C-proteinase enhancer-2 and bone morphogenetic protein-1. *J Lipid Res*, 2009, 50: 1330-9.
67. Segrest J.P., Amphipathic helices and plasma lipoproteins: thermodynamic and geometric considerations. *Chem Phys Lipids*, 1977,18: 7-22.
68. Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y.V., Anantharamaiah G.M., The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*, 1992, 33: 141-66.
69. Nolte R.T. and Atkinson D., Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. *Biophys J*, 1992, 63: 1221-39.
70. Brouillette C.G. and Anantharamaiah G.M., Structural models of human apolipoprotein A-I. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1256: 103-29.
71. Davidson W.S., Hazlett T., Mantulin W.W., Jonas A., The role of apolipoprotein A-I domains in lipid binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13605-10.
72. Gursky O. and Atkinson D., Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2991-5.
73. Silva R.A., Hilliard G.M., Fang J., Macha S., Davidson W.S., A three-dimensional molecular model of lipid-free apolipoprotein A-I determined by cross-linking/mass spectrometry and sequence threading. *Biochemistry*, 2005, 44: 2759-69.
74. Wu Z., Wagner M.A., Zheng L., Parks J.S., Shy J.M. III, Smith J.D., Gogonea V., Hazen S.L., The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 861-8.
75. Chetty P.S., Mayne L., Lund-Katz S., Stranz D., Englander S.W., Phillips M.C., Helical structure and stability in human apolipoprotein A-I by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 19005-10.
76. Rogers D.P., Brouillette C.G., Engler J.A., Tendian S,W, Roberts L., Mishra V,K,, Anantharamaiah G.M., Lund-Katz S., Phillips M.C., Ray M,J., Truncation of the amino terminus of human apolipoprotein A-I substantially alters only the lipid-free conformation. *Biochemistry*, 1997, 36: 288-300.

77. Rogers D.P., Roberts L.M., Lebowitz J., Engler J.A., Brouillette C.G., Structural analysis of apolipoprotein A-I: effects of amino- and carboxy-terminal deletions on the lipid-free structure. *Biochemistry*, 1998, 37: 945-55.
78. Saito H., Dhanasekaran P., Nguyen D., Holvoet .P, Lund-Katz S., Phillips M.C., Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model 1. *J Biol Chem*, 2003, 278: 23227-32.
79. Borhani D.W., Rogers D.P., Engler J.A., Brouillette C.G., Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 12291-6.
80. Mei X. and Atkinson D., Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization. *J Biol Chem*, 2011, 286: 38570-82.
81. Borhani D.W., Engler J.A., Brouillette C.G., Crystallization of truncated human apolipoprotein A-I in a novel conformation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55 (Pt 9): 1578-83.
82. Pollard R.D., Fulp B., Samuel M.P., Sorci-Thomas M.G., Thomas M.J., The conformation of lipid-free human apolipoprotein A-I in solution. *Biochemistry*, 2013, 52: 9470-81.
83. Segrest J.P., Jones M.K., Shao B., Heinecke J.W., An experimentally robust model of monomeric apolipoprotein A-I created from a chimera of two X-ray structures and molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, 2014, 53: 7625-40.
84. Zhang X., Lei D., Zhang L., Rames M., Zhang S., A model of lipid-free apolipoprotein A-I revealed by iterative molecular dynamics simulation. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0120233.
85. Melchior J.T., Walker R.G., Cooke A.L., Morris J., Castleberry M., Thompson T.B., Jones M.K., Song H.D., Rye K.A., Oda M.N., Sorci-Thomas M.G., Thomas M.J., Heinecke J.W., Mei X., Atkinson D., Segrest J.P., Lund-Katz S., Phillips M.C., Davidson W.S., A consensus model of human apolipoprotein A-I in its monomeric and lipid-free state. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24: 1093-9.
86. Brouillette C.G., Dong W.J., Yang Z.W., Ray M.J., Protasevich II, Cheung H.C., Engler J.A., Forster resonance energy transfer measurements are consistent with a helical bundle model for lipid-free apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, 2005, 44: 16413-25.

87. Mei X. and Atkinson D., Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res*, 2015, 46: 351-60.
88. Jonas A., Kezdy K.E., Wald J.H., Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. *J Biol Chem*, 1989, 264: 4818-24.
89. Silva R.A., Hilliard G.M., Li L., Segrest J.P., Davidson W.S., A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins. *Biochemistry*, 2005, 44: 8600-7.
90. Chetty P.S., Ohshiro M., Saito H., Dhanasekaran P., Lund-Katz S., Mayne L., Englander W., Phillips M.C., Effects of the Iowa and Milano mutations on apolipoprotein A-I structure and dynamics determined by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biochemistry*, 2012, 51: 8993-9001.
91. Phillips J.C., Wriggers W., Li Z., Jonas A., Schulten K., Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks. *Biophys J*, 1997, 73: 2337-46.
92. Segrest J.P., Jones M.K., Klon A.E., Sheldahl C.J., Hellinger M., De Loof H., Harvey S.C., A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1999, 274: 31755-8.
93. Wu Z., Gogonea V., Lee X., Wagner M.A., Li X.M., Huang Y., Undurti A., May R.P., Haertlein M., Moulin M., Gutsche I., Zaccai G., DiDonato J.A., Hazen S.L., Double superhelix model of high density lipoprotein. *J Biol Chem*, 2009, 284: 36605-19.
94. Koppaka V., Silvestro L., Engler J.A., Brouillette C.G., Axelsen P.H., The structure of human lipoprotein A-I. Evidence for the "belt" model. *J Biol Chem*, 1999, 274: 14541-4.
95. Martin D.D., Budamagunta M.S., Ryan R.O., Voss J.C., Oda M.N., Apolipoprotein A-I assumes a looped belt conformation on reconstituted high density lipoprotein. *J Biol Chem*, 2006, 281: 20418-24.
96. Catta A., Patterson J.C., Jones M.K., Jerome W.G., Bashtovyy D., Su Z., Gu F., Chen J., Aliste M.P., Harvey S.C., Li L., Weinstein G., Segrest J.P., Novel changes in discoidal high density lipoprotein morphology: a molecular dynamics study. *Biophys J*, 2006, 90: 4345-60.
97. Zhang L., Song J., Cavigliolo G., Ishida B.Y., Zhang S., Kane J.P., Weisgraber K.H., Oda M.N., Rye K.A., Pownall H.J., Ren G., Morphology

- and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy. *J Lipid Res*, 2011, 52: 175-84.
98. Silva R.A., Huang R., Morris J., Fang J., Gracheva E.O., Ren G., Kontush A., Jerome W.G., Rye K.A., Davidson W.S., Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12176-81.
 99. Huang R., Silva R.A., Jerome W.G., Kontush A., Chapman M.J., Curtiss L.K., Hodges T.J., Davidson W.S., Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 416-22.
 100. Gursky O., Crystal structure of Delta(185-243)ApoA-I suggests a mechanistic framework for the protein adaptation to the changing lipid load in good cholesterol: from flatland to sphereland via double belt, belt buckle, double hairpin and trefoil/tetrafoil. *J Mol Biol*, 2013, 425: 1-16.
 101. Dean M., Hamon Y., Chimini G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, 2001, 42: 1007-17.
 102. Fitzgerald M.L., Mendez A.J., Moore K.J., Andersson L.P., Panjeton H.A., Freeman M.W., ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH₂-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J Biol Chem*, 2001, 276: 15137-45.
 103. Cavelier L.B., Qiu Y., Bielicki J.K., Afzal V., Cheng J.F., Rubin E.M., Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice. *J Biol Chem*, 2001, 276: 18046-51.
 104. Kim W.S., Weickert C.S., Garner B., Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J Neurochem*, 2008, 104: 1145-66.
 105. Langmann T., Klucken J., Reil M., Liebisch G., Luciani M.F., Chimini G., Kaminski W.E., Schmitz G., Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257: 29-33.
 106. Kielar D., Dietmaier W., Langmann T., Aslanidis C., Probst M., Naruszewicz M., Schmitz G., Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem*, 2001, 47: 2089-97.

107. Neufeld E.B., Demosky S.J. Jr., Stonik J.A., Combs C., Remaley A.T., Duverger N., Santamarina-Fojo S., Brewer H.B. Jr., The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297: 974-9.
108. 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., Brewer H.B. Jr., Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem*, 2001, 276: 27584-90.
109. Takahashi Y. and Smith J.D., Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11358-63.
110. Lorenzi .I, von Eckardstein A., Radosavljevic S., Rohrer L., 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*, 2008, 1781: 306-13.
111. Cavelier C., Lorenzi .I, Rohrer L., von Eckardstein A., Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761: 655-66.
112. Ohnsorg P.M., Rohrer L., Perisa D., Kateifides A., Chroni A., Kardassis D., Zannis V.I., von Eckardstein A., Carboxyl terminus of apolipoprotein A-I (ApoA-I) is necessary for the transport of lipid-free ApoA-I but not prelipidated ApoA-I particles through aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 2011, 286: 7744-54.
113. Remaley A.T., Stonik J.A., Demosky S.J., Neufeld E.B., Bocharov A.V., Vishnyakova T.G., Eggerman T.L., Patterson A.P., Duverger N.J., Santamarina-Fojo S., Brewer H.B. Jr., Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280: 818-23.
114. Mendez A.J., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Oram J.F., Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol. *J Clin Invest*, 1994, 94: 1698-705.
115. Remaley A.T., Thomas F., Stonik J.A., Demosky S.J., Bark S.E., Neufeld E.B., Bocharov A.V., Vishnyakova T.G., Patterson A.P., Eggerman T.L., Santamarina-Fojo S., Brewer H.B., Synthetic amphipathic helical peptide mediated efflux of lipid from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway. *J Lipid Res*, 2003, 44: 828-36.

116. Yancey P.G., Bielicki J.K., Johnson W.J., Lund-Katz S., Palgunachari M.N., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Phillips M.C., Rothblat G.H., Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. *Biochemistry*, 1995, 34: 7955-65.
117. Singaraja R.R., Stahmer B., Brundert M., Merkel M., Heeren J., Bissada N., Kang M., Timmins J.M., Ramakrishnan R., Parks J.S., Hayden M.R., Rinninger F., Hepatic ATP-binding cassette transporter A1 is a key molecule in high-density lipoprotein cholesteryl ester metabolism in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 1821-7.
118. Timmins J.M., Lee J.Y., Boudyguina E., Kluckman K.D., Brunham L.R., Mulya A., Gebre A.K., Coutinho J.M., Colvin P.L., Smith T.L., Hayden M.R., Maeda N., Parks J.S., Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1333-42.
119. Reardon C.A., Kan H.Y., Cabana V., Blachowicz L., Lukens J.R., Wu Q., Liadaki K., Getz G.S., Zannis V.I., In vivo studies of HDL assembly and metabolism using adenovirus-mediated transfer of ApoA-I mutants in ApoA-I-deficient mice. *Biochemistry*, 2001, 40: 13670-80.
120. Chroni A., Liu T., Fitzgerald M.L., Freeman M.W., Zannis V.I., Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry*, 2004, 43: 2126-39.
121. Chroni A., Liu T., Gorshkova I., Kan HY, Uehara Y., von Eckardstein A., Zannis V.I., The central helices of apoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type apoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. *J Biol Chem*, 2003, 278: 6719-30.
122. Chroni A., Koukos G., Duka A, Zannis V.I., The carboxy-terminal region of apoA-I is required for the ABCA1-dependent formation of alpha-HDL but not prebeta-HDL particles in vivo. *Biochemistry*, 2007, 46: 5697-708.
123. Fotakis P., Kateifides A.K., Gkolfinopoulou C., Georgiadou D., Beck M., Grundler K., Chroni A., Stratikos E., Kardassis D., Zannis V.I., Role of the hydrophobic and charged residues in the 218-226 region of apoA-I in the biogenesis of HDL. *J Lipid Res*, 2013, 54: 3281-92.
124. Fotakis P., Tiniakou I., Kateifides A.K., Gkolfinopoulou C., Chroni A., Stratikos E., Zannis V.I., Kardassis D., Significance of the hydrophobic

- residues 225-230 of apoA-I for the biogenesis of HDL. *J Lipid Res*, 2013, 54: 3293-302.
125. Bodzioch M., Orso E., Klucken J., Langmann T., Bottcher A., Diederich W., Drobnik W., Barlage S., Buchler C., Porsch-Ozcurumez M., Kaminski W.E., Hahmann H.W., Oette K., Rothe G., Aslanidis C., Lackner K.J., Schmitz G., The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 1999, 22: 347-51.
 126. Fitzgerald M.L., Morris A.L., Rhee J.S., Andersson L.P., Mendez A.J., Freeman M.W., Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, 2002, 277: 33178-87.
 127. Fitzgerald M.L., Morris A.L., Chroni A., Mendez A.J., Zannis V.I., Freeman M.W., ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 2004, 45: 287-94.
 128. Glomset J.A., The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim Biophys Acta*, 1962, 65: 128-35.
 129. Jonas A., Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1529: 245-56.
 130. Peelman F., Vinaimont N., Verhee A., Vanloo B., Verschelde J.L., Labeur C., Seguret-Mace S., Duverger N., Hutchinson G., Vandekerckhove J., Tavernier J., Rosseneu M., A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Sci*, 1998, 7: 587-99.
 131. Piper D.E., Romanow W.G., Gunawardane R.N., Fordstrom P., Masterman S., Pan O., Thibault S.T., Zhang R., Meininger D., Schwarz M., Wang Z., King C., Zhou M., Walker N.P., The high-resolution crystal structure of human LCAT. *J Lipid Res*, 2015, 56: 1711-9.
 132. Glukhova A, Hinkovska-Galcheva V., Kelly R., Abe A., Shayman J.A., Tesmer J.J., Structure and function of lysosomal phospholipase A2 and lecithin:cholesterol acyltransferase. *Nat Commun*, 2015, 6: 6250.
 133. Holleboom A.G., Kuivenhoven J.A., Peelman F., Schimmel A.W., Peter J., Defesche J.C., Kastelein J.J., Hovingh G.K., Stroes E.S., Motazacker M.M., High prevalence of mutations in LCAT in patients with low HDL cholesterol levels in The Netherlands: identification and characterization of eight novel mutations. *Hum Mutat*, 2011, 32: 1290-8.

134. Yang C.Y., Manoogian D., Pao Q., Lee F.S., Knapp R.D., Gotto A.M. Jr., Pownall H.J., Lecithin:cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme. *J Biol Chem*, 1987, 262: 3086-91.
135. Jonas A., Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *Prog Lipid Res*, 1998, 37: 209-34.
136. Jauhiainen M. and Dolphin P.J., Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. An elucidation of the catalytic mechanism. *J Biol Chem*, 1986, 261: 7032-43.
137. Wang J., Gebre A.K., Anderson R.A., Parks J.S., Amino acid residue 149 of lecithin:cholesterol acyltransferase determines phospholipase A2 and transacylase fatty acyl specificity. *J Biol Chem*, 1997, 272: 280-6.
138. Rothblat G.H. and Phillips M.C., High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21: 229-38.
139. Rye K.A. and Barter P.J., Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res*, 2014, 114: 143-56.
140. Glomset J.A., The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*, 1968, 9: 155-67.
141. Matsuura F., Wang N., Chen W., Jiang X.C., Tall A.R., HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J Clin Invest*, 2006, 116: 1435-42.
142. Calabresi L. and Franceschini G., Lecithin:cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends Cardiovasc Med*, 2010, 20: 50-3.
143. Fielding C.J, Shore V.G., Fielding P.E., Lecithin: cholesterol acyltransferase: effects of substrate composition upon enzyme activity. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 270: 513-8.
144. Jones M.K., Catta A., Li L., Segrest J.P., Dynamics of activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, 2009, 48: 11196-210.
145. Sorci-Thomas M., Kearns M.W., Lee J.P., Apolipoprotein A-I domains involved in lecithin-cholesterol acyltransferase activation. Structure:function relationships. *J Biol Chem*, 1993, 268: 21403-9.
146. Sorci-Thomas M.G, Curtiss L., Parks J.S., Thomas M.J., Kearns M.W., Landrum M., The hydrophobic face orientation of apolipoprotein A-I

- amphipathic helix domain 143-164 regulates lecithin:cholesterol acyltransferase activation. *J Biol Chem*, 1998, 273: 11776-82.
147. Sviridov D., Hoang A., Sawyer W.H., Fidge N.H., Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the activation of Lecithin:Cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem*, 2000, 275: 19707-12.
 148. Alexander E.T., Bhat S., Thomas M.J., Weinberg R.B., Cook V.R., Bharadwaj M.S., Sorci-Thomas M., Apolipoprotein A-I helix 6 negatively charged residues attenuate lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) reactivity. *Biochemistry*, 2005, 44: 5409-19.
 149. Hoang A., Huang W., Sasaki J., Sviridov D., Natural mutations of apolipoprotein A-I impairing activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1631: 72-6.
 150. Kuivenhoven J.A., Pritchard H., Hill J., Frohlich J., Assmann G., Kastelein J., The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res*, 1997, 38: 191-205.
 151. Tarling E.J., Expanding roles of ABCG1 and sterol transport. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24: 138-46.
 152. Savary S., Denizot F., Luciani M., Mattei M., Chimini G., Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to Drosophila white gene. *Mamm Genome*, 1996, 7: 673-6.
 153. Vaughan A.M. and Oram J.F., ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by HDL but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem*, 2005, 280: 30150-7.
 154. Sturek J.M., Castle J.D., Trace A.P., Page L.C., Castle A.M., Evans-Molina C., Parks J.S., Mirmira R.G., Hedrick C.C., An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells. *J Clin Invest*, 2010, 120: 2575-89.
 155. Xie Q., Engel T., Schnoor M., Niehaus J., Hofnagel O., Buers I., Cullen P., Seedorf U., Assmann G., Lorkowski S., Cell surface localization of ABCG1 does not require LXR activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: e143-e144.
 156. Terasaka N., Wang N., Yvan-Charvet L., Tall A.R., High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15093-8.

157. Li D., Zhang Y., Ma J., Ling W., Xia M., Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 1354-62.
158. Daniil G., Zannis V.I., Chroni A., Effect of apoA-I mutations in the capacity of reconstituted HDL to promote ABCG1-mediated cholesterol efflux. *PLoS ONE*, 2013, 8: e67993.
159. Tarling E.J. and Edwards P.A., ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19719-24.
160. Chroni A., Kan H.Y., Kypreos K.E., Gorshkova I.N., Shkodrani A., Zannis V.I., Substitutions of glutamate 110 and 111 in the middle helix 4 of human apolipoprotein A-I (apoA-I) by alanine affect the structure and in vitro functions of apoA-I and induce severe hypertriglyceridemia in apoA-I-deficient mice. *Biochemistry*, 2004, 43: 10442-57.
161. Krieger M., Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 523-58.
162. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M., Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996, 271: 518-20.
163. Out R., Kruijt J.K., Rensen P.C., Hildebrand R.B., De Vos P., Van Eck M., van Berkel T.J., Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18401-6.
164. Out R., Hoekstra M., de Jager S.C., Vos P.D., van der Westhuyzen D.R., Webb N.R., Van Eck M., Biessen E.A., van Berkel T.J., Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor BI accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice. *J Lipid Res*, 2005, 46: 1172-81.
165. Krieger M., Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest*, 2001, 108: 793-7.
166. Chroni A., Nieland T.J., Kypreos K.E., Krieger M., Zannis V.I., SR-BI mediates cholesterol efflux via its interactions with lipid-bound ApoE. Structural mutations in SR-BI diminish cholesterol efflux. *Biochemistry*, 2005, 44: 13132-43.
167. Zhao Y., Pennings M., Hildebrand R.B., Ye D., Calpe-Berdiel L., Out R., Kjerrulf M., Hurt-Camejo E., Groen A.K., Hoekstra M., Jessup W., Chimini

- G., van Berkel T.J., Van E.M., Enhanced foam cell formation, atherosclerotic lesion development, and inflammation by combined deletion of ABCA1 and SR-BI in Bone marrow-derived cells in LDL receptor knockout mice on western-type diet. *Circ Res*, 2010, 107: e20-e31.
168. Fenske S.A., Yesilaltay A., Pal R., Daniels K., Barker C., Quinones V., Rigotti A., Krieger M., Kocher O., Normal hepatic cell surface localization of the high density lipoprotein receptor, scavenger receptor class B, type I, depends on all four PDZ domains of PDZK1. *J Biol Chem*, 2009, 284: 5797-806.
169. Ueda Y., Royer L., Gong E., Zhang J., Cooper P.N., Francone O., Rubin E.M., Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem*, 1999, 274: 7165-71.
170. Webb N.R., de Beer M.C., Yu J., Kindy M.S., Daugherty A., van der Westhuyzen D.R., de Beer F.C., Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice. *J Lipid Res*, 2002, 43: 1421-8.
171. Gu X., Lawrence R., Krieger M., Dissociation of the high density lipoprotein and low density lipoprotein binding activities of murine scavenger receptor class B type I (mSR-BI) using retrovirus library-based activity dissection. *J Biol Chem*, 2000, 275: 9120-30.
172. Chroni A., Kan H.Y., Shkodrani A., Liu T., Zannis V.I., Deletions of Helices 2 and 3 of Human ApoA-I Are Associated with Severe Dyslipidemia following Adenovirus-Mediated Gene Transfer in ApoA-I-Deficient Mice. *Biochemistry*, 2005, 44: 4108-17.
173. Zannis V.I., Koukos G., Drosatos K., Vezeridis A., Zanni E.E., Kypreos K.E., Chroni A., Discrete roles of apoA-I and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models. *Ann Med*, 2008, 40 Suppl 1: 14-28.
174. Miller M., Aiello D., Pritchard H., Friel G., Zeller K., Apolipoprotein A-I(Zavalla) (Leu159-->Pro): HDL cholesterol deficiency in a kindred associated with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18: 1242-7.
175. Tiniakou I., Kanaki Z., Georgopoulos S., Chroni A., Van E.M., Fotakis P., Zannis V.I., Kardassis D., Natural human apoA-I mutations L141RPisa and L159RFIN alter HDL structure and functionality and promote atherosclerosis development in mice. *Atherosclerosis*, 2015, 243: 77-85.

176. Recalde D., Velez-Carrasco W., Civeira F., Cenarro A., Gomez-Coronado D., Ordovas J.M., Pocovi M., Enhanced fractional catabolic rate of apo A-I and apo A-II in heterozygous subjects for apo A-I(Zaragoza) (L144R). *Atherosclerosis*, 2001, 154: 613-23.
177. Haase C.L., Frikke-Schmidt R., Nordestgaard B.G., Kateifides A.K., Kardassis D., Nielsen L.B., Andersen C.B., Kober L., Johnsen A.H., Grande P., Zannis V.I., Tybjaerg-Hansen A., Mutation in APOA1 predicts increased risk of ischaemic heart disease and total mortality without low HDL cholesterol levels. *J Intern Med*, 2011, 270: 136-46.
178. Hovingh G.K., Brownlie A., Bisoendial R.J., Dube M.P., Levels J.H., Petersen W., Dullaart R.P., Stroes E.S., Zwinderman A.H., de Groot E., Hayden M.R., Kuivenhoven J.A., Kastelein J.J., A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44: 1429-35.
179. Helgadottir A., Gretarsdottir S., Thorleifsson G., Hjartarson E., Sigurdsson A., Magnusdottir A., Jonasdottir A., Kristjansson H., Sulem P., Oddsson A., Sveinbjornsson G., Steinthorsdottir V., Rafnar T., Masson G., Jonsdottir I., Olafsson I., Eyjolfsson G.I., Sigurdardottir O., Daneshpour M.S., KhaliLi D., Azizi F., Swinkels D.W., Kiemeny L., Quyyumi A.A., Levey A.I., Patel R.S., Hayek S.S., Gudmundsdottir I.J., Thorgeirsson G., Thorsteinsdottir U., Gudbjartsson D.F., Holm H., Stefansson K., Variants with large effects on blood lipids and the role of cholesterol and triglycerides in coronary disease. *Nat Genet*, 2016, 48: 634-9.
180. Lusis A.J., Atherosclerosis. *Nature*, 2000, 407: 233-41.
181. Libby P., Bornfeldt K.E., Tall A.R., Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. *Circ Res*, 2016, 118: 531-4.
182. Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C., Kannel W.B., Dawber T.R., High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*, 1977, 62: 707-14.
183. Di Angelantonio E., Sarwar N., Perry P., Kaptoge S., Ray K.K., Thompson A., Wood A.M., Lewington S., Sattar N., Packard C.J., Collins R., Thompson S.G., Danesh J., Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*, 2009, 302: 1993-2000.
184. Gordon D.J., Probstfield J.L., Garrison R.J., Neaton J.D., Castelli W.P., Knoke J.D., Jacobs D.R. Jr., Bangdiwala S., Tyroler H.A., High-density

- lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*, 1989, 79: 8-15.
185. Rader D.J. and Tall A.R., The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? *Nat Med*, 2012, 18: 1344-6.
186. Ansell B.J., Navab M., Hama S., Kamranpour N., Fonarow G., Hough G., Rahmani S., Mottahedeh R., Dave R., Reddy S.T., Fogelman A.M., 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*, 2003, 108: 2751-6.
187. Mineo C. and Shaul P.W., Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. *Circ Res*, 2012, 111:1 079-90.
188. Vickers K,C, and Remaley A.T., HDL and cholesterol: life after the divorce? *J Lipid Res*, 2014, 55: 4-12.
189. Shah A.S., Tan L., Lu L.J., Davidson W.S., The proteomic diversity of high density lipoproteins: Our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res*, 2013, 54: 2575-85.
190. Negre-Salvayre A., Dousset N., Ferretti G., Bacchetti T., Curatola G., Salvayre R., Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41: 1031-40.
191. Vaisar T., Pennathur S., Green P.S., Gharib S.A., Hoofnagle A.N., Cheung M.C., Byun J., Vuletic S., Kassim S., Singh P., Chea H., Knopp R.H., Brunzell J., Geary R., Chait A., Zhao X.Q., Elkon K., Marcovina S., Ridker P., Oram J.F., Heinecke J.W., Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Inves*, 2007, 117: 746-56.
192. Wiesner P., Leidl K., Boettcher A., Schmitz G., Liebisch G., Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*, 2009, 50: 574-85.
193. Camont L., Lhomme M., Rached F., Le G.W., Negre-Salvayre A., Salvayre R., Calzada C., Lagarde M., Chapman M.J., Kontush A., Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: 2715-23.

194. Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T., MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 423-33.
195. Rosenson R.S., Brewer H.B. Jr., Davidson W.S., Fayad Z.A., Fuster V., Goldstein J., Hellerstein M., Jiang X.C., Phillips M.C., Rader D.J., Remaley A.T., Rothblat G.H., Tall A.R., Yvan-Charvet L., Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, 2012, 125: 1905-19.
196. Navab M., Berliner J.A., Subbanagounder G., Hama S., Lusis A.J., Castellani L.W., Reddy S., Shih D., Shi W., Watson A.D., Van Lenten B.J., Vora D., Fogelman A.M., HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 481-8.
197. Badimon L, and Vilahur G., LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1254: 18-32.
198. Mineo C. and Shaul P.W., Regulation of signal transduction by HDL. *J Lipid Res*, 2013, 54: 2315-24.
199. Cuchel M. and Rader D.J., Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*, 2006, 113: 2548-55.
200. Zanotti I., Favari E., Bernini F., Cellular cholesterol efflux pathways: impact on intracellular lipid trafficking and methodological considerations. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13: 292-302.
201. Rader D.J., High-density lipoproteins as an emerging therapeutic target for atherosclerosis. *JAMA*, 2003, 290: 2322-4.
202. Malaval C., Laffargue M., Barbaras R., Rolland C., Peres C., Champagne E., Perret B., Terce F., Collet X., Martinez L.O., RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cell Signal*, 2009, 21: 120-7.
203. Nijstad N., Gautier T., Briand F., Rader D.J., Tietge U.J., Biliary sterol secretion is required for functional in vivo reverse cholesterol transport in mice. *Gastroenterology*, 2011, 140: 1043-51.
204. Flammer A.J., Anderson T., Celermajer D.S., Creager M.A., Deanfield J., Ganz P., Hamburg N.M., Luscher T.F., Shechter M., Taddei S., Vita J.A., Lerman A., The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*, 2012, 126: 753-67.

205. Nofer J.R., van der Giet M., Tolle M., Wolinska I., von Wnuck L.K., Baba H.A., Tietge U.J., Godecke A., Ishii I., Kleuser B., Schafers M., Fobker M., Zidek W., Assmann G., Chun J., Levkau B., HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*, 2004, 113: 569-81.
206. Besler C., Heinrich K., Rohrer L., Doerries C., Riwanto M., Shih D.M., Chroni A., Yonekawa K., Stein S., Schaefer N., Mueller M., Akhmedov A., Daniil G., Manes C., Templin C., Wyss C., Maier W., Tanner F.C., Matter C.M., Corti R., Furlong C., Lusis A.J., von Eckardstein A., Fogelman A.M., Luscher T.F., Landmesser U., Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2693-708.
207. Li X.A., Titlow W.B., Jackson B.A., Giltiay N., Nikolova-Karakashian M., Uittenbogaard A., Smart E.J., High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem*, 2002, 277: 11058-63.
208. Yuhanna I.S., Zhu Y., Cox B.E., Hahner L.D., Osborne-Lawrence S., Lu P., Marcel Y.L., Anderson R.G., Mendelsohn M.E., Hobbs H.H., Shaul P.W., High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*, 2001, 7: 853-7.
209. Mineo C. , Yuhanna I.S., Quon M.J., Shaul P.W., High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem*, 2003, 278: 9142-9.
210. Nofer J.R., Junker R., Pulawski E., Fobker M., Levkau B., von Eckardstein A., Seedorf U., Assmann G., Walter M., High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *Thromb Haemost*, 2001, 85: 730-5.
211. Terasaka N., Westerterp M., Koetsveld J., Fernandez-Hernando C., Yvan-Charvet L., Wang N., Sessa W.C., Tall A.R., 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*, 2010, 30: 2219-25.
212. Kimura T., Sato K., Kuwabara A., Tomura H., Ishiwara M., Kobayashi I., Ui M., Okajima F., Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*, 2001, 276: 31780-5.

213. Riwanto M., Rohrer L., Roschitzki B., Besler C., Mocharla P., Mueller M., Perisa D., Heinrich K., Altwegg L., von Eckardstein A., Luscher T.F., Landmesser U., Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation*, 2013, 127: 891-904.
214. de Souza J.A., Vindis C., Negre-Salvayre A., Rye K.A., Couturier M., Therond .P, Chantepie S., Salvayre R., Chapman M.J., Kontush A., Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med*, 2010, 14: 608-20.
215. Seetharam D., Mineo C. , Gormley A.K., Gibson L.L., Vongpatanasin W., Chambliss K.L., Hahner L.D., Cummings M.L., Kitchens R.L., Marcel Y.L., Rader D.J., Shaul P.W., High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res*, 2006, 98: 63-72.
216. Mineo C., Deguchi H., Griffin J.H., Shaul P.W., Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*, 2006, 98: 1352-64.
217. Zhu W., Saddar S., Seetharam D., Chambliss K.L., Longoria C., Silver D.L., Yuhanna I.S., Shaul P.W., Mineo C. , The scavenger receptor class B type I adaptor protein PDZK1 maintains endothelial monolayer integrity. *Circ Res*, 2008, 102: 480-7.
218. Zerrad-Saadi A., Therond P., Chantepie S., Couturier M., Rye K.A., Chapman M.J., Kontush A., HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 2169-75.
219. Garner B., Waldeck A.R., Witting P.K., Rye K.A., Stocker R., Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem*, 1998, 273: 6088-95.
220. Watson A.D., Berliner J.A., Hama S.Y., La Du B.N., Faull K.F., Fogelman A.M., Navab M., Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1995, 96: 2882-91.

221. Navab M., Hama S.Y., Anantharamaiah G.M., Hassan K., Hough G.P., Watson A.D., Reddy S.T., Sevanian A., Fonarow G.C., Fogelman A.M., Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*, 2000, 41: 1495-508.
222. Tward A., Xia Y.R., Wang X.P., Shi Y.S., Park C., Castellani L.W., Lusis A.J., Shih D.M., Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*, 2002, 106: 484-90.
223. 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., Lusis AJ, Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 1998, 394: 284-7.
224. Tselepis A.D. and John C.M., Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl*, 2002, 3: 57-68.
225. Noto H., Hara M., Karasawa K., Iso O., Satoh H., Togo M., Hashimoto Y., Yamada Y., Kosaka T., Kawamura M., Kimura S., Tsukamoto K., Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 829-35.
226. Goyal J., Wang K., Liu M., Subbaiah P.V., Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J Biol Chem*, 1997, 272: 16231-9.
227. Vohl M.C., Neville T.A., Kumarathasan R., Braschi S., Sparks D.L., A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry*, 1999, 38: 5976-81.
228. Mertens A., Verhamme P., Bielicki J.K., Phillips M.C., Quarck R., Verreth W., Stengel D., Ninio E., Navab M., Mackness B., Mackness M., Holvoet P., Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation*, 2003, 107: 1640-6.
229. McGrath K.C., Li X.H., Puranik R., Liang E.C., Tan J.T., Dy V.M., DiBartolo B.A., Barter P.J., Rye K.A., Heather A.K., Role of 3beta-hydroxysteroid-delta 24 reductase in mediating antiinflammatory effects of high-density

- lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 877-82.
230. Wu B.J., Chen K., Shrestha S., Ong K.L., Barter P.J., Rye K.A., High-density lipoproteins inhibit vascular endothelial inflammation by increasing 3beta-hydroxysteroid-Delta24 reductase expression and inducing heme oxygenase-1. *Circ Res*, 2013, 112: 278-88.
231. Kimura T., Tomura H., Mogi C., Kuwabara A., Damirin A., Ishizuka T., Sekiguchi A., Ishiwara M., Im D.S., Sato K., Murakami M., Okajima F., Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2006, 281: 37457-67.
232. Brewer H.B. Jr., High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 387-91.
233. Nofer J.R., Tepel M., Kehrel B., Walter M., Seedorf U., Assmann G., Zidek W., High density lipoproteins enhance the Na⁺/H⁺ antiport in human platelets. *Thromb Haemost*, 1996, 75:635-41.
234. Calkin A.C., Drew B.G., Ono A., Duffy S.J., Gordon M.V., Schoenwaelder S.M., Sviridov D., Cooper M.E., Kingwell B.A., Jackson S.P., Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation*, 2009, 120: 2095-104.
235. Li D., Weng S., Yang B., Zander D.S., Saldeen T., Nichols W.W., Khan S., Mehta J.L., Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 378-83.
236. Aviram M., Sirtori C.R., Colli S., Maderna P., Morazzoni G., Tremoli E., Plasma lipoproteins affect platelet malondialdehyde and thromboxane B2 production. *Biochem Med*, 1985, 34: 29-36.
237. Mehta J.L. and Chen L.Y., Reversal by high-density lipoprotein of the effect of oxidized low-density lipoprotein on nitric oxide synthase protein expression in human platelets. *J Lab Clin Med*, 1996, 127: 287-95.
238. Brill A., Yesilaltay A., De Meyer S.F., Kisucka J., Fuchs T.A., Kocher O., Krieger M., Wagner D.D., Extrahepatic high-density lipoprotein receptor SR-BI and apoA-I protect against deep vein thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 1841-7.

239. Zhang Q.H., Zu X.Y., Cao R.X., Liu J.H., Mo Z.C., Zeng Y., Li Y.B., Xiong S.L., Liu X., Liao D.F., Yi G.H., An involvement of SR-B1 mediated PI3K-Akt-eNOS signaling in HDL-induced cyclooxygenase 2 expression and prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420: 17-23.
240. Griffin J.H., Kojima K., Banka C.L., Curtiss L.K., Fernandez J.A., High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest*, 1999, 103: 219-27.
241. Marz W., Kleber M.E., Scharnagl H., Speer T., Zewinger S., Ritsch A., Parhofer K.G., von Eckardstein A., Landmesser U., Laufs U., HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin Res Cardiol*, 2017, 106: 663-75.
242. Voight B.F., Peloso G.M., Orho-Melander M., Frikke-Schmidt R., Barbalic M., Jensen M.K., Hindy G., Holm H., Ding E.L., Johnson T., Schunkert H., Samani N.J., Clarke R., Hopewell J.C., Thompson J.F., Li M., Thorleifsson G., Newton-Cheh C., Musunuru K., Pirruccello J.P., Saleheen D., Chen L., Stewart A., Schillert A., Thorsteinsdottir U., Thorgeirsson G., Anand S., Engert J.C., Morgan T., Spertus J., Stoll M., Berger K., Martinelli N., Girelli D., McKeown P.P., Patterson C.C., Epstein S.E., Devaney J., Burnett M.S., Mooser V., Ripatti S., Surakka I., Nieminen M.S., Sinisalo J., Lokki M.L., Perola M., Havulinna A., de FU, Gigante B., Ingelsson E., Zeller T., Wild P., de Bakker P.I., Klungel O.H., Maitland-van der Zee A.H., Peters B.J., de B.A., Grobbee D.E., Kamphuisen P.W., Deneer V.H., Elbers C.C., Onland-Moret N.C., Hofker M.H., Wijmenga C., Verschuren W.M., Boer J.M., van der Schouw Y.T., Rasheed A., Frossard P., Demissie S., Willer C., Do R., Ordovas J.M., Abecasis G.R., Boehnke M., Mohlke K.L., Daly M.J., Guiducci C., Burt P., Surti A., Gonzalez E., Purcell S., Gabriel S., Marrugat J., Peden J., Erdmann J., Diemert P., Willenborg C., Konig I.R., Fischer M., Hengstenberg C., Ziegler A., Buysschaert I., Lambrechts D., Van de Werf F., Fox K.A., El Mokhtari N.E., Rubin D., Schrezenmeir J., Schreiber S., Schafer A., Danesh J., Blankenberg S., Roberts R., McPherson R., Watkins H., Hall A.S., Overvad K., Rimm E., Boerwinkle E., Tybjaerg-Hansen A., Cupples L.A., Reilly M.P., Melander O., Mannucci P.M., Ardissino D., Siscovick D., Elosua R., Stefansson K., O'Donnell C.J., Salomaa V., Rader D.J., Peltonen L., Schwartz S.M., Altshuler D., Kathiresan S., Plasma HDL cholesterol and

- risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*, 2012, 380: 572-80.
243. Riwanto M., Rohrer L., von Eckardstein A., Landmesser U., Dysfunctional HDL: from structure-function-relationships to biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 224: 337-66.
244. Khera A.V., Cuchel M., Llera-Moya M., Rodrigues A., Burke M.F., Jafri K., French B.C., Phillips J.A., Mucksavage M.L., Wilensky R.L., Mohler E.R., Rothblat G.H., Rader D.J., Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*, 2011, 364: 127-35.
245. Sorrentino S.A., Besler C., Rohrer L., Meyer M., Heinrich K., Bahlmann F.H., Mueller M., Horvath T., Doerries C., Heinemann M., Flemmer S., Markowski A., Manes C., Bahr M.J., Haller H., von Eckardstein A., Drexler H., Landmesser U., Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*, 2010, 121: 110-22.
246. Luscher T.F., Landmesser U., von Eckardstein A., Fogelman A.M., High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circ Res*, 2014, 114: 171-82.
247. Navab M., Fogelman A.M., Berliner J.A., Territo M.C., Demer L.L., Frank J.S., Watson A.D., Edwards P.A., Lusis A.J., Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1995, 76: 18C-23C.
248. Navab M., Reddy S.T., Van Lenten B.J., Fogelman A.M., HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8: 222-32.
249. Annema W., Nijstad N., Tolle M., de Boer J.F., Buijs R.V., Heeringa P., van der Giet M., Tietge U.J., Myeloperoxidase and serum amyloid A contribute to impaired in vivo reverse cholesterol transport during the acute phase response but not group IIA secretory phospholipase A(2). *J Lipid Res*, 2010, 51: 743-54.
250. Chiba T., Chang M.Y., Wang S., Wight T.N., McMillen T.S., Oram J.F., Vaisar T., Heinecke J.W., De Beer F.C., De Beer M.C., Chait A., Serum amyloid A facilitates the binding of high-density lipoprotein from mice injected with lipopolysaccharide to vascular proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 1326-32.

251. Vuilleumier N., Dayer J.M., von Eckardstein A., Roux-Lombard P., Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in high-density lipoproteins? *Swiss Med Wkly*, 2013, 143: w13781.
252. Teng N., Maghzal G.J., Talib J., Rashid I., Lau A.K., Stocker R., The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep*, 2017, 22: 51-73.
253. Nicholls S.J. and Hazen S.L., Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J Lipid Res*, 2009, 50 Suppl: S346-S351.
254. Zheng L., Settle M., Brubaker G., Schmitt D., Hazen S.L., Smith J.D., Kinter M., Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem*, 2005, 280: 38-47.
255. Huang Y., DiDonato J.A., Levison B.S., Schmitt D., Li L., Wu Y., Buffa J., Kim T., Gerstenecker G.S., Gu X., Kadiyala C.S., Wang Z., Culley M.K., Hazen J.E., DiDonato A.J., Fu X., Berisha S.Z., Peng D., Nguyen TT, Liang S, Chuang CC, Cho L, Plow EF, Fox PL, Gogonea V., Tang W.H., Parks J.S., Fisher E.A., Smith J.D., Hazen S.L., An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nat Med*, 2014, 20: 193-203.
256. Tietge U.J.F., The impact of myeloperoxidase on HDL function in myocardial infarction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2018, 25: 137-42.
257. Lindstedt L., Saarinen J., Kalkkinen N., Welgus H., Kovanen P.T., 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*, 1999, 274: 22627-34.
258. Lindstedt L. and Kovanen P.T., Plasmin and kallikrein reduce HDL-induced cholesterol efflux from foam cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277: 552-7.
259. Lindstedt L., Lee M., Castro G.R., Fruchart J.C., Kovanen P.T., Chymase in exocytosed rat mast cell granules effectively proteolyzes apolipoprotein A-I-containing lipoproteins, so reducing the cholesterol efflux-inducing ability of serum and aortic intimal fluid. *J Clin Invest*, 1996, 97: 2174-82.
260. Peters M.J., van Eijk I.C., Smulders Y.M., Serne E., Dijkmans B.A., van der Horst-Bruinsma I.E., Nurmohamed M.T., Signs of accelerated preclinical

- atherosclerosis in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2010, 37: 161-6.
261. Shoenfeld Y., Gerli R., Doria A., Matsuura E., Cerinic M.M., Ronda N., Jara L.J., Abu-Shakra M., Meroni P.L., Sherer Y., Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation*, 2005, 112: 3337-47.
262. Olama S.M. and Elarman M.M., Evaluation of paraoxonase and arylesterase activities in Egyptian patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*, 2013, 33: 1487-94.
263. Charles-Schoeman C., Watanabe J., Lee Y.Y., Furst D.E., Amjadi S., Elashoff D., Park G., McMahon M., Paulus H.E., Fogelman A.M., Reddy S.T., Abnormal function of high-density lipoprotein is associated with poor disease control and an altered protein cargo in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 2870-9.
264. McMahon M., Grossman J., FitzGerald J., Dahlin-Lee E., Wallace D.J., Thong B.Y., Badsha H., Kalunian K., Charles C., Navab M., Fogelman A.M., Hahn B.H., Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54: 2541-9.
265. Charles-Schoeman C., Lee Y.Y., Grijalva V., Amjadi S., FitzGerald J., Ranganath V.K., Taylor M., McMahon M., Paulus H.E., Reddy S.T., Cholesterol efflux by high density lipoproteins is impaired in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71: 1157-62.
266. Ronda N., Favari E., Borghi M.O., Ingegnoli F., Gerosa M., Chighizola C., Zimetti F., Adorni M.P., Bernini F., Meroni P.L., Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73: 609-15.
267. Mathieu S., Gossec L., Dougados M., Soubrier M., Cardiovascular profile in ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011, 63: 557-63.
268. Papagoras C., Voulgari P.V., Drosos A.A., Atherosclerosis and cardiovascular disease in the spondyloarthritides, particularly ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 2013, 31: 612-20.
269. Haque S., Mirjafari H., Bruce I.N., Atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Lipidol*, 2008, 19: 338-43.

270. Appel H., Loddenkemper C., Miossec P., Rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis - pathology of acute inflammation. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27: S15-S19.
271. Amezcua-Guerra L.M., Overlap between systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: is it real or just an illusion? *J Rheumatol*, 2009, 36: 4-6.
272. Viitanen J.V., Kautiainen H., Kokko M.L., Ala-Peijari S., Age and spinal mobility in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol*, 1995, 24: 314-5.
273. Viitanen J.V., Kautiainen H., Suni J., Kokko M.L., Lehtinen K., The relative value of spinal and thoracic mobility measurements in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol*, 1995, 24: 94-7.
274. McCool F.D., Kelly K.B., Loring S.H., Greaves I.A., Mead J., Estimates of ventilation from body surface measurements in unrestrained subjects. *J Appl Physiol*, 1986, 61: 1114-9.
275. Grimby G., Fugl-Meyer A.R., Blomstrand A., Partitioning of the contributions of rib cage and abdomen to ventilation in ankylosing spondylitis. *Thorax*, 1974, 29: 179-84.
276. McCool F.D., Tzelepis G.E., Leith D.E., Hoppin F.G. Jr., Oxygen cost of breathing during fatiguing inspiratory resistive loads. *J Appl Physiol*, 1989, 66: 2045-55.
277. Wanders A.J., Gorman J.D., Davis J.C., Landewe R.B., van der Heijde D.M., Responsiveness and discriminative capacity of the assessments in ankylosing spondylitis disease-controlling antirheumatic therapy core set and other outcome measures in a trial of etanercept in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 2004, 51: 1-8.
278. Khoury N. and Goldberg A.C., The use of fibric Acid derivatives in cardiovascular prevention. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2011, 13: 335-42.
279. Vega G.L. and Grundy S.M., Lipoprotein responses to treatment with lovastatin, gemfibrozil, and nicotinic acid in normolipidemic patients with hypoalphalipoproteinemia. *Arch Intern Med*, 1994, 154: 73-82.
280. 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., Duggan W.T., Bots M.L., Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1620-30.
281. Barter P.J. and Rye K.A., HDL cholesterol concentration or HDL function: which matters? *Eur Heart J*, 2017, 38: 2487-9.

282. Bowman L., Hopewell J.C., Chen F., Wallendszus K., Stevens W., Collins R., Wiviott S.D., Cannon C.P., Braunwald E., Sammons E., Landray M.J., Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N Engl J Med*, 2017, 377: 1217-27.
283. Yamashita S., Ruscica M., Macchi C., Corsini A., Matsuzawa Y., Sirtori C.R., Cholesteryl ester transfer protein: An enigmatic pharmacology - Antagonists and agonists. *Atherosclerosis*, 2018, 278: 286-98.
284. Armitage J., Holmes M.V., Preiss D., Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition for Preventing Cardiovascular Events: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73: 477-87.
285. Rosenson R.S., Wright R.S., Farkouh M., Plutzky J., Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects. *Am Heart J*, 2012, 164: 672-80.
286. Terasaka N., Hiroshima A., Koieyama T., Ubukata N., Morikawa Y., Nakai D., Inaba T., T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Letters*, 2003, 536: 6-11.
287. Joseph S.B., McKilligin E., Pei L., Watson M.A., Collins A.R., Laffitte B.A., Chen M., Noh G., Goodman J., Hagger G.N., Tran J., Tippin T.K., Wang X., Lusis A.J., Hsueh W.A., Law R.E., Collins J.L., Willson T.M., Tontonoz P., Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7604-9.
288. 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., Fogelman A.M., 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*, 2004, 109: 3215-20.
289. Bloedon L.T., Dunbar R., Duffy D., Pinell-Salles P., Norris R., DeGroot B.J., Movva R., Navab M., Fogelman A.M., Rader D.J., Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J Lipid Res*, 2008, 49: 1344-52.
290. Watson C.E., Weissbach N., Kjems L., Ayalasomayajula S., Zhang Y., Chang I., Navab M., Hama S., Hough G., Reddy S.T., Soffer D., Rader D.J., Fogelman A.M., Schechter A., Treatment of patients with cardiovascular

- disease with L-4F, an apo-A1 mimetic, did not improve select biomarkers of HDL function. *J Lipid Res*, 2011, 52: 361-73.
291. Amar M.J., D' Souza W., Turner S., Demosky S., Sviridov D., Stonik J., Luchoomun J., Voogt J., Hellerstein M., Sviridov D., Remaley A.T., 5A apolipoprotein mimetic peptide promotes cholesterol efflux and reduces atherosclerosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334: 634-41.
292. Di Bartolo B.A., Nicholls S.J., Bao S., Rye K.A., Heather A.K., Barter P.J., Bursill C., The apolipoprotein A-I mimetic peptide ETC-642 exhibits anti-inflammatory properties that are comparable to high density lipoproteins. *Atherosclerosis*, 2011, 217: 395-400.
293. Di Bartolo B.A., Vanags L.Z., Tan J.T., Bao S., Rye K.A., Barter P.J., Bursill C.A., The apolipoprotein A-I mimetic peptide, ETC-642, reduces chronic vascular inflammation in the rabbit. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 224.
294. Miyazaki A., Sakuma S., Morikawa W., Takiue T., Miake F., Terano T., Sakai M., Hakamata H., Sakamoto Y., Natio M., Yingmao R., Kiyoshi T., Takao O., Seikoh H., Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15: 1882-8.
295. Franceschini G., Sirtori C.R., Capurso A., Weisgraber K.H., Mahley R.W., A-I-Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest*, 1980, 66: 892-900.
296. Ibanez B., Giannarelli C., Cimmino G., Santos-Gallego C.G., Alique M., Pinero A., Vilahur G., Fuster V., Badimon L., Badimon J.J., Recombinant HDL(Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL(wild-type). *Atherosclerosis*, 2012, 220: 72-7.
297. Ameli S., Hultgardh-Nilsson A., Cercek B., Shah P.K., Forrester J.S., Ageland H., Nilsson J., Recombinant apolipoprotein A-I Milano reduces intimal thickening after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, 1994, 90: 1935-41.
298. 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., Halpern S., Crowe T., Blankenship J.C., Kerensky R., Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2003, 290: 2292-300.

299. Reijers J.A.A., Kallend D.G., Malone K.E., Jukema J.W., Wijngaard P.L.J., Burggraaf J., Moerland M., MDCO-216 Does Not Induce Adverse Immunostimulation, in Contrast to Its Predecessor ETC-216. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2017, 31: 381-9.
300. Nicholls S.J., Puri R., Ballantyne C.M., Jukema J.W., Kastelein J.J.P., Koenig W., Wright R.S., Kallend D., Wijngaard P., Borgman M., Wolski K., Nissen S.E., Effect of Infusion of High-Density Lipoprotein Mimetic Containing Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Coronary Disease in Patients With an Acute Coronary Syndrome in the MILANO-PILOT Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*, 2018, 3: 806-14.
301. Easton R., Gille A., D' Andrea D., Davis R., Wright S.D., Shear C., A multiple ascending dose study of CSL112, an infused formulation of ApoA-I. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54: 301-10.
302. Warnick G.R., Benderson J., Albers J.J., Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem*, 1982, 28: 1379-88.
303. Meattini F., Prencipe L., Bardelli F., Giannini G., Tarli P., The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem*, 1978, 24: 2161-5.
304. Navab M., Hama S.Y., Hough G.P., Subbanagounder G., Reddy S.T., Fogelman A.M., A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res*, 2001, 42: 1308-17.
305. 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., Tsimikas S., Hazen S.L., Chroni A., Kuivenhoven J.A., Lipid oxidation in carriers of lecithin:cholesterol acyltransferase gene mutations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 3066-75.
306. Tsimihodimos V., Karabina S.A., Tambaki A.P., Bairaktari E., Goudevenos J.A., Chapman M.J., Elisaf M., Tselepis A.D., Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 306-11.
307. Griffith F., The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*, 1928, 27: 113-59.

308. Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med*, 1944, 79: 137-58.
309. Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J.P., Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 181-96.
310. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.
311. Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H., One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2172-5.
312. Argyri L., Skamnaki V., Stratikos E., Chroni A., A simple approach for human recombinant apolipoprotein E4 expression and purification. *Protein Expr Purif*, 2011, 79: 251-7.
313. Meselson M. and Yuan R., DNA restriction enzyme from E. coli. *Nature*, 1968, 217: 1110-4.
314. Arber W., Promotion and limitation of genetic exchange. *Science*, 1979, 205: 361-5.
315. Aaij C. and Borst P., The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 269: 192-200.
316. Birnboim H.C. and Doly J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7: 1513-23.
317. Studier F.W. and Moffatt B.A., Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 1986, 189: 113-30.
318. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W., Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 1990, 185: 60-89.
319. Dubendorff J.W. and Studier F.W., Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol*, 1991, 219: 45-59.
320. Vanderheiden G.J., Fairchild A.C., Jago G.R., Construction of a laboratory press for use with the French pressure cell. *Appl Microbiol*, 1970, 19: 875-7.

321. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, 258: 598-9.
322. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A., New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, 1987, 411: 177-84.
323. Bornhorst J.A. and Falke J.J., Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol*, 2000, 326: 245-54.
324. Shirangi M., Sastre T.J., Sellergren B., Hennink W.E., Somsen G.W., van Nostrum C.F., Methylation of peptides by N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) under conditions used for free radical polymerization: a mechanistic study. *Bioconjug Chem*, 2015, 26: 90-100.
325. Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 1970, 227: 680-&.
326. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-54.
327. Matz C.E. and Jonas A., Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J Biol Chem*, 1982, 257: 4535-40.
328. Laccotripe M., Makrides S.C., Jonas A., Zannis V.I., The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1997, 272: 17511-22.
329. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-75.
330. Peterson G.L., Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*, 1979, 100: 201-20.
331. Blanche P.J., Gong E.L., Forte T.M., Nichols A.V., Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 665: 408-19.
332. Nichols A.V., Krauss R.M., Musliner T.A., Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, 1986, 128: 417-31.
333. Kobayashi Y. and Mandsley D.V. Applications of liquid scintillation counting. *Academic Press, London*, 1974.

334. Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1751: 119-39.
335. Robinson D.R. and Jencks W.P., The effect of compounds of the urea-guanidinium class on the activity coefficient of acetyltetraglycine ethyl ester and related compounds. *J Am Chem Soc*, 1965, 87: 2462-70.
336. Garcia-Moreno B., Estimating binding constants for site-specific interactions between monovalent ions and proteins. *Methods Enzymol*, 1994, 240: 645-67.
337. Greenfield N. and Fasman G.D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 1969, 8: 4108-16.
338. Berova N., Nakanishi K., Woody R.W., Circular Dichroism: Principles and Applications. *New York: John Wiley & Sons*, 2000, 1-877.
339. Woody R.W., Circular dichroism. *Methods Enzymol*, 1995, 246: 34-71.
340. Woody R.W. and Koslowski A., Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and alpha-helical polypeptides. *Biophys Chem*, 2002, 101-102: 535-51.
341. Sreerama N. and Woody R.W., Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol*, 2004, 383: 318-51.
342. Whitmore L. and Wallace B.A., Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 2008, 89: 392-400.
343. Sreerama N. and Woody R.W., Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*, 2000, 287: 252-60.
344. Holzwarth G. and Doty P., The ultraviolet circular dichroism of polypeptides. *J Am Chem Soc*, 1965, 87: 218-28.
345. Vournakis J.N., Yan J.F., Scheraga H.A., Effect of side chains on the conformational energy and rotational strength of the n-pi transition for some alpha-helical poly-alpha-amino acids. *Biopolymers*, 1968, 6: 1531-50.
346. Woody R.W. and Tinoco I. Jr., Optical rotation of oriented helices III. Calculation of the rotatory dispersion and circular dichroism of the alpha- and 3_{10} -helix. *J Chem Phys*, 1967, 46: 4927-4945.
347. Adler A.J., Greenfield N.J., Fasman G.D., Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol*, 1973, 27: 675-735.

348. Greenfield N.J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 2006, 1: 2876-90.
349. Pace C.N., Shirley B.A., Thomson J.A., In Protein Structure: A practical approach., (Ed. Creighton T.E.), IRL Press Limited, Oxford, 1989, 311-30.
350. Gorshkova I.N., Liadaki K., Gursky O., Atkinson D., Zannis V.I., Probing the lipid-free structure and stability of apolipoprotein A-I by mutation. *Biochemistry*, 2000, 39: 15910-9.
351. Tanaka M., Vedhachalam C., Sakamoto T., Dhanasekaran P., Phillips M.C., Lund-Katz S., Saito H., Effect of carboxyl-terminal truncation on structure and lipid interaction of human apolipoprotein E4. *Biochemistry*, 2006, 45: 4240-7.
352. Eftink M.R., The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J*, 1994, 66: 482-501.
353. Mei X.H. and Atkinson D., Determining the folding domain of lipid free apoA-I in solution by mutation. *Heart*, 2012, 98: E273-275.
354. Chroni A., Pyrpassopoulos S., Thanassoulas A., Nounesis G., Zannis V.I., Stratikos E., Biophysical analysis of progressive C-terminal truncations of human apolipoprotein E4: insights into secondary structure and unfolding properties. *Biochemistry*, 2008, 47: 9071-80.
355. Case D.A., Cheatham T.E. III, Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M. Jr., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J., The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem*, 2005, 26: 1668-88.
356. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C., ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*, 2015, 11: 3696-713.
357. Roe D.R. and Cheatham T.E. III, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*, 2013, 9: 3084-95.
358. Haidar B., Denis M., Krimbou L., Marcil M., Genest J. Jr., cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J Lipid Res*, 2002, 43: 2087-94.
359. Chadwick A.C. and Sahoo D., Functional characterization of newly-discovered mutations in human SR-BI. *PLoS ONE*, 2012, 7: e45660.
360. Sankaranarayanan S., Oram J.F., Asztalos B.F., Vaughan A.M., Lund-Katz S., Adorni M.P., Phillips M.C., Rothblat G.H., Effects of acceptor composition

- and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 2009, 50: 275-84.
361. Liu T., Krieger M., Kan H.Y., Zannis V.I., 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*, 2002, 277: 21576-84.
 362. Tran-Dinh A., Diallo D., Delbosc S., Varela-Perez L.M., Dang Q.B., Lapergue B., Burillo E., Michel J.B., Levoye A., Martin-Ventura J.L., Meilhac O., HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*, 2013, 169: 493-511.
 363. Walker J.M., The bicinechoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 1994, 32: 5-8.
 364. Yagi K., Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*, 1998, 108: 101-6.
 365. Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G., Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 1997, 272: 217-21.
 366. LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C., Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 1992, 5: 227-31.
 367. van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A., Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*, 1984, 27: 361-8.
 368. Garrett S., Jenkinson T., Kennedy L.G., Whitelock H., Gaisford P., Calin A., A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol*, 1994, 21: 2286-91.
 369. Braun J. and Sieper J., Ankylosing spondylitis. *Lancet*, 2007, 369: 1379-90.
 370. Han C., Robinson D.W. Jr., Hackett M.V., Paramore L.C., Fraeman K.H., Bala M.V., Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2006, 33: 2167-72.
 371. Szabo S.M., Levy A.R., Rao S.R., Kirbach S.E., Lacaille D., Cifaldi M., Maksymowych W.P., Increased risk of cardiovascular and cerebrovascular

- diseases in individuals with ankylosing spondylitis: a population-based study. *Arthritis Rheum*, 2011, 63: 3294-304.
372. Annema W. and von Eckardstein A., High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circ J*, 2013, 77: 2432-48.
373. Rohrer L., Hersberger M., von Eckardstein A., High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 2004, 15: 269-78.
374. Ronda N., Favari E., Borghi M.O., Ingegnoli F., Gerosa M., Chighizola C., Zimetti F., Adorni M.P., Bernini F., Meroni P.L., Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73: 609-15.
375. Appel H., Loddenkemper C., Miossec P., Rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis - pathology of acute inflammation. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27: S15-S19.
376. Marquez-Velasco R., Rodriguez-Henriquez P., Bojalil R., Amezcua-Guerra L.M., Interleukin 6 is associated with pulmonary involvement in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2009, 36: 2615-6.
377. Rohatgi A., Khera A., Berry J.D., Givens E.G., Ayers C.R., Wedin K.E., Neeland I.J., Yuhanna I.S., Rader D.R., de Lemos J.A., Shaul P.W., HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*, 2014, 371: 2383-93.
378. Khera A.V., Cuchel M., Llera-Moya M., Rodrigues A., Burke M.F., Jafri K., French B.C., Phillips J.A., Mucksavage M.L., Wilensky R.L., Mohler E.R., Rothblat G.H., Rader D.J., Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*, 2011, 364: 127-35.
379. Davidson W.S., Silva R.A., Chantepie S., Lagor W.R., Chapman M.J., Kontush A., Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 870-6.
380. Zheng L., Nukuna B., Brennan M.L., Sun M., Goormastic M., Settle M., Schmitt D., Fu X., Thomson L., Fox P.L., Ischiropoulos H., Smith J.D., Kinter M., Hazen S.L., Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 2004, 114: 529-41.

381. Undurti A., Huang Y., Lupica J.A., Smith J.D., DiDonato J.A., Hazen S.L., Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. *J Biol Chem*, 2009, 284: 30825-35.
382. Rosenblat M., Karry R., Aviram M., Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis*, 2006, 187: 74-81.
383. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S., Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972, 18: 499-502.
384. Capkin E., Kiris A., Karkucak M., Durmus I., Gokmen F., Cansu A., Tosun M., Ayar A., Investigation of effects of different treatment modalities on structural and functional vessel wall properties in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine*, 2011, 78: 378-82.
385. Spanakis E., Sidiropoulos P., Papadakis J., Ganotakis E., Katsikas G., Karvounaris S., Bizaki A., Kritikos H., Boumpas D.T., Modest but sustained increase of serum high density lipoprotein cholesterol levels in patients with inflammatory arthritides treated with infliximab. *J Rheumatol*, 2006, 33: 2440-6.
386. van Eijk I.C., de Vries M.K., Levels J.H., Peters M.J., Huizer E.E., Dijkmans B.A., van der Horst-Bruinsma I.E., Hazenberg B.P., van de Stadt R.J., Wolbink G.J., Nurmohamed M.T., Improvement of lipid profile is accompanied by atheroprotective alterations in high-density lipoprotein composition upon tumor necrosis factor blockade: a prospective cohort study in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 1324-30.
387. Mathieu S., Dubost J.J., Tournadre A., Malochet-Guinamand S., Ristori J.M., Soubrier M., Effects of 14 weeks of TNF alpha blockade treatment on lipid profile in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine*, 2010, 77: 50-2.
388. Tang W.H., Hartiala J., Fan Y., Wu Y., Stewart A.F., Erdmann J., Kathiresan S., Roberts R., McPherson R., Allayee H., Hazen S.L., Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 2803-12.
389. Haraguchi Y., Toh R., Hasokawa M., Nakajima H., Honjo T., Otsui K., Mori K., Miyamoto-Sasaki M., Shinohara M., Nishimura K., Ishida T., Hirata K., Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of

- dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2014, 234: 288-94.
390. Sorci-Thomas M.G., Parks J.S., Kearns M.W., Pate G.N., Zhang C., Thomas M.J., High level secretion of wild-type and mutant forms of human proapoA-I using baculovirus-mediated Sf-9 cell expression. *J Lipid Res*, 1996, 37: 673-83.
391. Mallory J.B., Kushner P.J., Protter A.A., Cofer C.L., Appleby V.L., Lau K., Schilling J.W., Vigne J.L., Expression and characterization of human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 1987, 262: 4241-7.
392. Forte T.M., McCall M.R., Amacher S., Nordhausen R.W., Vigne J.L., Mallory J.B., Physical and chemical characteristics of apolipoprotein A-I-lipid complexes produced by Chinese hamster ovary cells transfected with the human apolipoprotein A-I gene. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1047: 11-8.
393. Raussens V., Fisher C.A., Goormaghtigh E., Ryan R.O., Ruyschaert J.M., The low density lipoprotein receptor active conformation of apolipoprotein E. Helix organization in n-terminal domain-phospholipid disc particles. *J Biol Chem*, 1998, 273: 25825-30.
394. Fisher C.A., Narayanaswami V., Ryan R.O., The lipid-associated conformation of the low density lipoprotein receptor binding domain of human apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33601-6.
395. Davidson W.S. and Silva R.A., Apolipoprotein structural organization in high density lipoproteins: belts, bundles, hinges and hairpins. *Curr Opin Lipidol*, 2005, 16: 295-300.
396. Kypreos K.E. and Zannis V.I., Pathway of biogenesis of apolipoprotein E-containing HDL in vivo with the participation of ABCA1 and LCAT. *Biochem J*, 2007, 403: 359-67.
397. Panagotopoulos S.E., Witting S.R., Horace E.M., Nicholas M.J., Sean D.W., Bacterial expression and characterization of mature apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif*, 2002, 25: 353-61.
398. Ryan R.O., Forte T.M., Oda M.N., Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif*, 2003, 27: 98-103.
399. Tubb M.R., Smith L.E., Davidson W.S., Purification of recombinant apolipoproteins A-I and A-IV and efficient affinity tag cleavage by tobacco etch virus protease. *J Lipid Res*, 2009, 50: 1497-504.

400. Saito H., Dhanasekaran P., Nguyen D., Deridder E., Holvoet P., Lund-Katz S., Phillips M.C., Alpha-helix formation is required for high affinity binding of human apolipoprotein A-I to lipids. *J Biol Chem*, 2004, 279: 20974-81.
401. Gorshkova I.N., Liu T., Kan H.Y., Chroni A., Zannis V.I., Atkinson D., Structure and stability of apolipoprotein a-I in solution and in discoidal high-density lipoprotein probed by double charge ablation and deletion mutation. *Biochemistry*, 2006, 45: 1242-54.
402. McGuire K.A., Davidson W.S., Jonas A., High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I. *J Lipid Res*, 1996, 37: 1519-28.
403. Rogers D.P., Roberts L.M., Lebowitz J., Datta G., Anantharamaiah G.M., Engler J.A., Brouillette C.G., The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: effects of amino-terminal deletions. *Biochemistry*, 1998, 37: 11714-25.
404. Wong Y.Q., Binger K.J., Howlett G.J., Griffin M.D., Methionine oxidation induces amyloid fibril formation by full-length apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 1977-82.
405. Mei X., Liu M., Herscovitz H., Atkinson D., Probing the C-terminal domain of lipid-free apoA-I demonstrates the vital role of the H10B sequence repeat in HDL formation. *J Lipid Res*, 2016, 57: 1507-17.
406. Asztalos B.F., Cupples L.A., Demissie S., Horvath K.V., Cox C.E., Batista M.C., Schaefer E.J., High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 2181-7.
407. Barter P., Kastelein J., Nunn A., Hobbs R., High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis, the unanswered questions. *Atherosclerosis*, 2003, 168: 195-211.
408. 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., Navab M., 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*, 1995, 96: 2758-67.
409. Otocka-Kmieciak A., Mikhailidis D.P., Nicholls S.J., Davidson M., Rysz J., Banach M., Dysfunctional HDL: a novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease? *Prog Lipid Res*, 2012, 51: 314-24.

410. Zannis V.I., Kardassis D., Zanni E.E., Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Adv Hum Genet*, 1993, 21: 145-319.
411. Murphy A.J., Westerterp M., Yvan-Charvet L., Tall A.R., Anti-atherogenic mechanisms of high density lipoprotein: effects on myeloid cells. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821: 513-21.
412. Recalde D., Velez-Carrasco W., Civeira F., Cenarro A., Gomez-Coronado D., Ordovas J.M., Pocovi M., Enhanced fractional catabolic rate of apo A-I and apo A-II in heterozygous subjects for apo A-I(Zaragoza) (L144R). *Atherosclerosis*, 2001, 154: 613-23.
413. Tiniakou I., Kanaki Z., Georgopoulos S., Chroni A., Van E.M., Fotakis P., Zannis V.I., Kardassis D., Natural human apoA-I mutations L141RPisa and L159RFIN alter HDL structure and functionality and promote atherosclerosis development in mice. *Atherosclerosis*, 2015, 243: 77-85.
414. Gorshkova I.N., Mei X., Atkinson D., Binding of human apoA-I[K107del] variant to TG-rich particles: implications for mechanisms underlying hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*, 2014, 55: 1876-85.
415. Gorshkova I.N. and Atkinson D., Increased Binding of Apolipoproteins A-I and E4 to Triglyceride-Rich Lipoproteins is linked to Induction of Hypertriglyceridemia. *JSM Atheroscler*, 2017, 2: 1026.
416. Tanaka M., Dhanasekaran P., Nguyen D., Nickel M., Takechi Y., Lund-Katz S., Phillips M.C., Saito H., Influence of N-terminal helix bundle stability on the lipid-binding properties of human apolipoprotein A-I. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811: 25-30.
417. Oda M.N., Lipid-free apoA-I structure - Origins of model diversity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862: 221-33.
418. Oram J.F. and Heinecke J.W., ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*, 2005, 85: 1343-72.
419. Recalde D., Cenarro A., Garcia-Otin A.L., Gomez-Coronado D., Civeira F., Pocovi M., Analysis of apolipoprotein A-I, lecithin:cholesterol acyltransferase and glucocerebrosidase genes in hypoalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 2002, 163: 49-58.
420. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W., Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 2013, 496: 445-55.

421. Gelissen I.C., Harris M., Rye K.A., Quinn C., Brown A.J., Kockx M., Cartland S., Packianathan M., Kritharides L., Jessup W., ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 534-40.
422. Dijkers A. and Tietge U.J., Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol*, 2010, 16: 5936-45.
423. Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J., Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 2007, 115: 1285-95.
424. Landmesser U., Hornig B., Drexler H., Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*, 2004, 109: II27-II33.
425. Kimura T., Sato K., Malchinkhuu E., Tomura H., Tamama K., Kuwabara A., Murakami M., Okajima F., High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 1283-8.
426. Mineo C. and Shaul P.W., Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17: 156-61.
427. Pan B., Ma Y., Ren H., He Y., Wang Y., Lv X., Liu D., Ji L., Yu B., Wang Y., Chen Y.E., Pennathur S., Smith J.D., Liu G., Zheng L., Diabetic HDL is dysfunctional in stimulating endothelial cell migration and proliferation due to down regulation of SR-BI expression. *PLoS ONE*, 2012, 7: e48530.
428. Bowry V.W., Stanley K.K., Stocker R., High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 10316-20.
429. Watson A.D., Navab M., Hama S.Y., Sevanian A., Prescott S.M., Stafforini D.M., McIntyre T.M., Du B.N., Fogelman A.M., Berliner J.A., Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1995, 95: 774-82.
430. Besler C., Luscher T.F., Landmesser U., Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med*, 2012, 4: 251-68.
431. Li D., Liu L., Chen H., Sawamura T., Ranganathan S., Mehta J.L., LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 2003, 107: 612-7.

432. Marsche G., Levak-Frank S., Quehenberger O., Heller R., Sattler W., Malle E., Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J*, 2001, 15: 1095-7.
433. Mooradian A.D. and Haas M.J., Targeting high-density lipoproteins: increasing de novo production versus decreasing clearance. *Drugs*, 2015, 75: 713-22.
434. Ridker P.M., Genest J., Boekholdt S.M., Libby P., Gotto A.M., Nordestgaard B.G., Mora S., MacFadyen J.G., Glynn R.J., Kastelein J.J., HDL cholesterol and residual risk of first cardiovascular events after treatment with potent statin therapy: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet*, 2010, 376: 333-9.
435. Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C., Kannel W.B., Dawber T.R., Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. The Framingham study. *Ann Intern Med*, 1977, 87: 393-7.
436. von Eckardstein A. and Rohrer L., HDLs in crises. *Curr Opin Lipidol*, 2016, 27: 264-73.
437. von Eckardstein A., Implications of torcetrapib failure for the future of HDL therapy: is HDL-cholesterol the right target? *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8: 345-58.
438. Monera O.D., Zhou N.E., Kay C.M., Hodges R.S., Comparison of antiparallel and parallel two-stranded alpha-helical coiled-coils. Design, synthesis, and characterization. *J Biol Chem*, 1993, 268: 19218-27.
439. Tripet B., Vale R.D., Hodges R.S., Demonstration of coiled-coil interactions within the kinesin neck region using synthetic peptides. Implications for motor activity. *J Biol Chem*, 1997, 272: 8946-56.
440. Cece H., Yazgan P., Karakas E., Karakas O., Demirkol A., Toru I., Aksoy N., Carotid intima-media thickness and paraoxonase activity in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med*, 2011, 34: E225.
441. McMahon M., Grossman J., Skaggs B., FitzGerald J., Sahakian L., Ragavendra N., Charles-Schoeman C., Watson K., Wong W.K., Volkmann E., Chen W., Gorn A., Karpouzas G., Weisman M., Wallace D.J., Hahn B.H., Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 2428-37.

442. Davidson W.S., Silva R.A., Chantepie S., Lagor W.R., Chapman M.J., Kontush A., Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 870-6.
443. Undurti A., Huang Y., Lupica J.A., Smith J.D., DiDonato J.A., Hazen S.L., Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. *J Biol Chem*, 2009, 284: 30825-35.
444. Tang W.H., Hartiala J., Fan Y., Wu Y., Stewart A.F., Erdmann J., Kathiresan S., Roberts R., McPherson R., Allayee H., Hazen S.L., Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 2803-12.
445. Zhang R., Brennan M.L., Fu X., Aviles R.J., Pearce G.L., Penn M.S., Topol E.J., Sprecher D.L., Hazen S.L., Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*, 2001, 286: 2136-42.
446. Pan B., Yu B., Ren H., Willard B., Pan L., Zu L., Shen X., Ma Y., Li X., Niu C., Kong J., Kang S., Eugene C.Y., Pennathur S., Zheng L., High-density lipoprotein nitration and chlorination catalyzed by myeloperoxidase impair its effect of promoting endothelial repair. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 272-81.
447. Lautermann D. and Braun J., Ankylosing spondylitis--cardiac manifestations. *Clin Exp Rheumatol*, 2002, 20: S11-S15.
448. Sari I., Okan T., Akar S., Cece H., Altay C., Secil M., Birlik M., Onen F., Akkoc N., Impaired endothelial function in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45: 283-6.
449. Argyri L., Dafnis I., Theodossiou T.A., Gantz D., Stratikos E., Chroni A., Molecular basis for increased risk for late-onset Alzheimer disease due to the naturally occurring L28P mutation in apolipoprotein E4. *J Biol Chem*, 2014, 289: 12931-45.
450. Georgiadou D., Stamatakis K., Efthimiadou E.K., Kordas G., Gantz D., Chroni A., Stratikos E., Thermodynamic and structural destabilization of apoE3 by hereditary mutations associated with the development of lipoprotein glomerulopathy. *J Lipid Res*, 2013, 54: 164-76.
451. Katsarou M., Stratikos E., Chroni A., Thermodynamic destabilization and aggregation propensity as the mechanism behind the association of apoE3 mutants and lipoprotein glomerulopathy. *J Lipid Res*, 2018, 59: 2339-48.

452. Dafnis I., Argyri L., Chroni A., Amyloid-peptide beta 42 Enhances the Oligomerization and Neurotoxicity of apoE4: The C-terminal Residues Leu279, Lys282 and Gln284 Modulate the Structural and Functional Properties of apoE4. *Neuroscience*, 2018, 394: 144-55.
453. Dafnis I., Argyri L., Sagnou M., Tzinia A., Tsilibary E.C., Stratikos E., Chroni A., The ability of apolipoprotein E fragments to promote intraneuronal accumulation of amyloid beta peptide 42 is both isoform and size-specific. *Sci Rep*, 2016, 6: 30654.
454. Petrlova J., Duong T., Cochran M.C., Axelsson A., Morgelin M., Roberts L.M., Lagerstedt J.O., The fibrillogenic L178H variant of apolipoprotein A-I forms helical fibrils. *J Lipid Res*, 2012, 53: 390-8.
455. Schaefer E.J., Anthanont P., Asztalos B.F., High-density lipoprotein metabolism, composition, function, and deficiency. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25: 194-9.
456. Getz G.S. and Reardon C.A., Genetic control of apoprotein A-I and atheroprotection: some insights from inbred strains of mice. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28: 403-7.
457. Rosenson R.S., Brewer H.B. Jr., Ansell B.J., Barter P., Chapman M.J., Heinecke J.W., Kontush A., Tall A.R., Webb N.R., Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13: 48-60.
458. Sorci-Thomas M.G and Thomas M.J., The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12: 121-8.
459. Obici L., Franceschini G., Calabresi L., Giorgetti S., Stoppini M., Merlini G., Bellotti V., Structure, function and amyloidogenic propensity of apolipoprotein A-I. *Amyloid*, 2006, 13: 191-205.
460. Sorci-Thomas M.G., Curtiss L., Parks J.S., Thomas M.J., Kearns M.W., Alteration in apolipoprotein A-I 22-mer repeat order results in a decrease in lecithin:cholesterol acyltransferase reactivity. *J Biol Chem*, 1997, 272: 7278-84.
461. Miccoli R., Zhu Y., Daum U., Wessling J., Huang Y., Navalesi R., Assmann G., von Eckardstein A., A natural apolipoprotein A-I variant, apoA-I (L141R)Pisa, interferes with the formation of alpha-high density lipoproteins (HDL) but not with the formation of pre beta 1-HDL and influences efflux of cholesterol into plasma. *J Lipid Res*, 1997, 38: 1242.

462. Miettinen H.E., Jauhiainen M., Gylling H., Ehnholm S., Palomaki A., Miettinen T.A., Kontula K., Apolipoprotein A-IFIN (Leu159-->Arg) mutation affects lecithin cholesterol acyltransferase activation and subclass distribution of HDL but not cholesterol efflux from fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 3021-32.
463. Miettinen H.E., Gylling H., Miettinen T.A., Viikari J., Paulin L., Kontula K., Apolipoprotein A-IFin. Dominantly inherited hypoalphalipoproteinemia due to a single base substitution in the apolipoprotein A-I gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 83-90.
464. Daum U., Leren T.P., Langer C., Chirazi A., Cullen P., Pritchard P.H., Assmann G., von Eckardstein A., Multiple dysfunctions of two apolipoprotein A-I variants, apoA- I(R160L)Oslo and apoA-I(P165R), that are associated with hypoalphalipoproteinemia in heterozygous carriers. *J Lipid Res*, 1999, 40: 486-94.
465. Daum U., Langer C., Duverger N., Emmanuel F., Benoit P., Deneffe P., Chirazi A., Cullen P., Pritchard P.H., Bruckert E., Assmann G., von Eckardstein A., Apolipoprotein A-I (R151C)Paris is defective in activation of lecithin: cholesterol acyltransferase but not in initial lipid binding, formation of reconstituted lipoproteins, or promotion of cholesterol efflux. *J Mol Med*, 1999, 77: 614-22.
466. Hutchins P.M. and Heinecke J.W., Cholesterol efflux capacity, macrophage reverse cholesterol transport and cardioprotective HDL. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26: 388-93.
467. Aiello R.J., Brees D., Bourassa P.A., Royer L., Lindsey S., Coskran T., Haghpassand M., Francone O.L., Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 630-7.
468. Van E.M., Singaraja R.R., Ye D., Hildebrand R.B., James E.R., Hayden M.R., van Berkel T.J., Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 929-34.
469. Shao B., Tang C., Sinha A., Mayer P.S., Davenport G.D., Brot N., Oda M.N., Zhao X.Q., Heinecke J.W., Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase. *Circ Res*, 2014, 114: 1733-42.

470. Libby P., Bornfeldt K.E., Tall A.R., Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. *Circ Res*, 2016, 118: 531-4.
471. Dalla-Riva J., Lagerstedt J.O., Petrlova J., Structural and Functional Analysis of the ApolipoproteinA-I A164S Variant. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0143915.
472. Murugesan G., Sa G., Fox P.L., High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. *Circ Res*, 1994, 74: 1149-56.
473. Kratzer A., Giral H., Landmesser U., High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res*, 2014, 103: 350-61.
474. Assanasen C., Mineo C., Seetharam D., Yuhanna I.S., Marcel Y.L., Connelly M.A., Williams D.L., Llera-Moya M., Shaul P.W., Silver D.L., Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J Clin Invest*, 2005, 115: 969-77.
475. Iwata A., Miura S., Zhang B., Imaizumi S., Uehara Y., Shiomi M., Saku K., Antiatherogenic effects of newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide/phospholipid complexes against aortic plaque burden in Watanabe-heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*, 2011, 218: 300-7.
476. Easton R., Gille A., D' Andrea D., Davis R., Wright S.D., Shear C., A multiple ascending dose study of CSL112, an infused formulation of ApoA-I. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54: 301-10.
477. Gursky O., Mei X., Atkinson D., The crystal structure of the C-terminal truncated apolipoprotein A-I sheds new light on amyloid formation by the N-terminal fragment. *Biochemistry*, 2012, 51: 10-8.
478. Arciello A., Piccoli R., Monti D.M., Apolipoprotein A-I: the dual face of a protein. *FEBS Letters*, 2016, 590: 4171-9.
479. Nichols W.C., Dwulet F.E., Liepnieks J., Benson M.D., Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 156: 762-8.
480. Liu M., Mei X., Herscovitz H., Atkinson D., N-terminal mutation of apoA-I and interaction with ABCA1 reveal mechanisms of nascent HDL biogenesis. *J Lipid Res*, 2019, 60: 44-57.
481. Kateifides A.K., Gorshkova I.N., Duka A., Chroni A., Kardassis D., Zannis V.I., Alteration of negatively charged residues in the 89 to 99 domain of ApoA-I affects lipid homeostasis and the maturation of HDL. *J Lipid Res*, 2011, 52: 1363-72.

482. Georgiadou D., Chroni A., Vezeridis A., Zannis V.I., Stratikos E., Biophysical analysis of apolipoprotein E3 variants linked with development of type III hyperlipoproteinemia. *PLoS ONE*, 2011, 6: e27037.
483. Wang S., Gulshan K., Brubaker G., Hazen S.L., Smith J.D., ABCA1 mediates unfolding of apolipoprotein AI N terminus on the cell surface before lipidation and release of nascent high-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: 1197-205.
484. Kono M., Okumura Y., Tanaka M., Nguyen D., Dhanasekaran P., Lund-Katz S., Phillips M.C., Saito H., Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein a-I bound to spherical lipid particles. *Biochemistry*, 2008, 47: 11340-7.
485. Pollard R.D., Fulp B., Sorci-Thomas M.G., Thomas M.J., High-Density Lipoprotein Biogenesis: Defining the Domains Involved in Human Apolipoprotein A-I Lipidation. *Biochemistry*, 2016, 55: 4971-81.
486. Hoekstra M., SR-BI as target in atherosclerosis and cardiovascular disease - A comprehensive appraisal of the cellular functions of SR-BI in physiology and disease. *Atherosclerosis*, 2017, 258: 153-61.
487. Cuchel M., Lund-Katz S., Llera-Moya M., Millar J.S., Chang D., Fuki I., Rothblat G.H., Phillips M.C., Rader D.J., Pathways by which reconstituted high-density lipoprotein mobilizes free cholesterol from whole body and from macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 526-32.
488. Gu X., Kozarsky K., Krieger M., Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J Biol Chem*, 2000, 275: 29993-30001.
489. Ji Y., Jian B., Wang N., Sun Y., Moya M.L., Phillips M.C., Rothblat G.H., Swaney J.B., Tall A.R., Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*, 1997, 272: 20982-5.
490. Ueda Y., Gong E., Royer L., Cooper P.N., Francone O.L., Rubin E.M., Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics. *J Biol Chem*, 2000, 275: 20368-73.
491. Wang N., Arai T., Ji Y., Rinninger F., Tall A.R., Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1998, 273: 32920-6.

492. Out R., Hoekstra M., Spijkers J.A., Kruijt J.K., Van Eck M., Bos I.S., Twisk J., van Berkel T.J., Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J Lipid Res*, 2004, 45: 2088-95.
493. Rigotti A., Trigatti B.L., Penman M., Rayburn H., Herz J., Krieger M., A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 12610-5.
494. Thuahnai S.T., Lund-Katz S., Dhanasekaran P., Llera-Moya M., Connelly M.A., Williams D.L., Rothblat G.H., Phillips M.C., Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. *J Biol Chem*, 2004, 279: 12448-55.
495. Catalano G., Duchene E., Julia Z., Le G.W., Bruckert E., Chapman M.J., Guerin M., Cellular SR-BI and ABCA1-mediated cholesterol efflux are gender-specific in healthy subjects. *J Lipid Res*, 2008, 49: 635-43.
496. Larrede S., Quinn C.M., Jessup W., Frisdal E., Olivier M., Hsieh V., Kim M.J., Van E.M., Couvert P., Carrie A., Giral P., Chapman M.J., Guerin M., Le G.W., Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 1930-6.
497. Linton M.F., Tao H., Linton E.F., Yancey P.G., SR-BI: A Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28: 461-72.