



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Μονάδα Κλινικής Γονιδιωματικής και Φαρμακογονιδιωματικής
Δ' Παθολογική Κλινική, Τομέας Παθολογίας
Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Μπούμπας

Φαρμακογονιδιωματική αξιολόγηση της δράσης της ανασυσταμένης
HDL με απολιποπρωτεΐνη E3 κατά της αθηροσκλήρωσης

ΕΥΤΑΞΙΑ-ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΒΑΛΑΝΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2022

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Φαρμοκογονιδιωματική αξιολόγηση της δράσης της ανασυσταμένης HDL με
απολιποπρωτεΐνη E3 κατά της αθηροσκλήρωσης

Ευταξία-Κωνσταντίνα Βαλαντή

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ (ΕΚΠΑ):** Καθηγητής Γεράσιμος Δ. Σιάσος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δέσποινα Σανούδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
(Επιβλέπουσα)

Δημήτρης Καρδάσης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Α', Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ
«Δημόκριτος»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δέσποινα Σανούδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
(Επιβλέπουσα)

Δημήτρης Καρδάσης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Α', Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ
«Δημόκριτος»

Χαράλαμπος Βλαχόπουλος, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
Κυριάκος Κυπραίος, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών
Ευάγγελος Μανωλόπουλος, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο
Θράκης

Ανδρέας Παπαπετρόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ημερομηνία Αιτήσεως Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 03/02/2014

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 22/12/2014

Ημερομηνία Ορισμού Θέματος της Διδακτορικής Διατριβής: 16/12/2016

Ημερομηνία Καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής: 14/10/2022

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: "ΑΡΙΣΤΑ"

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αθηροσκληρωτική στεφανιαία νόσος (ASCAD) είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως, παρά την πλειάδα διαθέσιμων αντιλιπιδαιμικών φαρμάκων, καθιστώντας αναγκαία την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η αύξηση των επιπέδων της HDL (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας) χοληστερόλης (HDL-C) του πλάσματος από μόνη της έχει αποδειχθεί ότι δεν επαρκεί για την επίτευξη αθηροπροστασίας, αλλά πρέπει να διασφαλίζεται η λειτουργικότητα της HDL. Προς αυτή την κατεύθυνση και δεδομένου των πολυάριθμων αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της απολιποπρωτεΐνης E3 (apoE3), η ανασυγκροτημένη HDL που περιέχει ανθρώπινη apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3) αντιπροσωπεύει μία υποσχόμενη αλλά σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη θεραπευτική προσέγγιση. Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάστηκε στην αξιολόγηση της αθηροπροστατευτικής δράσης της rHDL-apoE3 σε κυτταρικό, μοριακό και λειτουργικό επίπεδο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν φαρμακογονιδιωματικές αναλύσεις αιχμής, όπου αξιολογήθηκε η συνολική γονιδιακή έκφραση σε πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EK) αορτής (HAEC) μετά από επώαση με rHDL-apoE3 ή PBS (κύτταρα αναφοράς) με τη χρήση μικροσυστοιχιών και στη συνέχεια high-throughput ποσοτικής RT-PCR. Μέσω πολυεπίπεδης βιοπληροφορικής ανάλυσης ανακαλύψαμε ότι η rHDL-apoE3 προκάλεσε στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην έκφραση 198 γονιδίων των HAEC, τα οποία σχετίζονται, κυρίως, με λειτουργίες που εμπλέκονται στην αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου και στη ρύθμιση της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης. Μέσω ενδεδειγμένων αναλύσεων εξόρυξης δεδομένων προσδιορίσαμε ότι η rHDL-apoE3 προκάλεσε αλλαγές γονιδιακής έκφρασης σε πολυάριθμα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό (37 γονίδια), τη διαφοροποίηση (25), την απόπτωση (26) και την επιβίωση (14) των EK. Η μετανάστευση των EK ήταν η πιο στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένη λειτουργία όπου κατηγοριοποιήθηκαν τα περισσότερα αλλαγμένα μεταγράφα (44). Εν τω βάθει μελέτη των συγκεκριμένων μεταγράφων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών, υπέδειξε τον κεντρικό τους ρόλο στα καίρια σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης των EK: 1) MEK1/2/ERK1/2, 2) PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, 3) RHO-GTPασών και 4) ιντεγκρινών. Η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 υπερέκφραση τεσσάρων γονιδίων-κλειδιών των μονοπατιών αυτών - PIK3CG, EFNB2, ID1 και FLT1 - επιβεβαιώθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο στα πρωτογενή ανθρώπινα EK στεφανιαίας αρτηρίας (HCAEC) και στην κυτταρική σειρά των ανθρώπινων EK EA.hy926. Η rHDL-apoE3 αύξησε επίσης τη φωσφορυλίωση βασικών μορίων-τελεστών των προαναφερόμενων μονοπατιών - ERK1/2,

AKT, p38 MAPK και eNOS - στα κύτταρα αυτά. Επιπλέον, η rHDL-apoE3 αύξησε τη μετανάστευση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων, όπως προέκυψε από δοκιμασίες προσομοίωσης “επούλωσης πληγής” και τύπου “transwell”. Η αναστολή των κινασών MEK1/2 μέσω του χημικού αναστολέα PD98059 εμπόδισε την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 μετανάστευση των HCAEC και ενεργοποίηση των ERK1/2 κινασών στα κύτταρα αυτά. Ομοίως, η αναστολή της PI3K κινάσης μέσω του χημικού αναστολέα LY294002 μείωσε σημαντικά την επαγωγή της μετανάστευσης των HCAEC από την rHDL-apoE3 και εμπόδισε την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 φωσφορυλίωση των κινασών AKT και p38 MAPK στα κύτταρα αυτά. Η χημική αναστολή της PI3K δεν επηρέασε τη φωσφορυλίωση της eNOS από την rHDL-apoE3 στα HCAEC, υποδηλώνοντας έναν εμπλεκόμενο μηχανισμό ανεξάρτητο της PI3K. Η γονιδιακή αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα ID1 μέσω siRNA μείωσε σημαντικά την επαγωγή της μετανάστευσης των EA.hy926 κυττάρων από την rHDL-apoE3 εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των ERK1/2 και AKT.

Τα συνολικά αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποδεικνύουν ότι η rHDL-apoE3 επιδρά σε ένα εύρος μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την αθηροπροστασία. Εστιάζοντας συγκεκριμένα στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθοριστικό ρόλο στη δράση αυτή αποδεικνύεται ότι παίζουν τα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών, τα οποία ενεργοποιούνται μέσω υπερέκφρασης του ID1. Μέσω αυτών των μηχανισμών η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Στο σύνολο τους τα ευρήματά μας υποστηρίζουν την προοπτική η rHDL-apoE3 να επάγει την επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου, με δυνητικές κλινικές εφαρμογές στη θεραπεία της ASCAD στο εγγύς μέλλον.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακογονιδιωματική, Βιολογία Καρδιάς και Αγγείων, Ιατρική Ακριβείας, Βιολογικά Φάρμακα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Γονιδιωματική, Βιολογικά φάρμακα, Αθηροσκλήρωση, Καρδιαγγειακά νοσήματα, HDL, Απολιποπρωτεΐνη E3, Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων

ABSTRACT

Atherosclerotic coronary artery disease (ASCAD) is the leading cause of mortality worldwide, despite the multitude of available lipid-lowering drugs, raising the need for novel and more effective therapeutic approaches. Increasing plasma HDL (High Density Lipoprotein) cholesterol (HDL-C) levels alone is not sufficient for achieving atheroprotection, but rather HDL functionality must be ensured. Towards this direction and given the numerous atheroprotective properties of apolipoprotein E3 (apoE3), reconstituted HDL containing human apoE3 and phospholipids (rHDL-apoE3) represents a promising yet largely unexplored therapeutic agent. The current PhD thesis focused on the evaluation of the atheroprotective potential of rHDL-apoE3 at the cellular, molecular and functional level.

Firstly, cutting-edge pharmacogenomic analysis evaluating whole genome expression of primary human aortic endothelial cells (ECs) (HAEC) treated with rHDL-apoE3 or PBS (control) was performed using microarrays followed by high-throughput quantitative RT-PCR. Multilevel bioinformatical analysis revealed that rHDL-apoE3 induced significant expression changes in 198 genes of HAEC mainly associated with functions that are involved in vascular endothelial repair following injury and regulation of atherosclerosis progression. Following extensive literature mining it emerged that rHDL-apoE3 induced expression changes in numerous signaling pathways involved in proliferation (37 genes), differentiation (25), apoptosis (26) and survival (14) of ECs. EC migration was the most highly and significantly changed function, with 42 significantly changed genes. In-depth investigation of the role of these transcripts and their corresponding proteins revealed their central role in the main EC migration-related signaling pathways: 1) MEK1/2/ERK1/2, 2) PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, 3) RHO-GTPases, and 4) integrin. The rHDL-apoE3 induced overexpression of four key genes of these pathways - PIK3CG, EFN2, ID1 and FLT1 - was also validated at the protein level in primary human coronary artery ECs (HCAEC) and the human EC line EA.hy926. rHDL-apoE3 also increased the phosphorylation of main downstream effectors of these pathways - ERK1/2, AKT, p38 MAPK and eNOS - in these cells. In addition, rHDL-apoE3 increased migration of HCAEC and EA.hy926 cells, as assessed by "wound healing" and "transwell" migration assays. MEK1/2 inhibition using the chemical inhibitor PD98059 completely prevented rHDL-apoE3-induced HCAEC migration and inhibited rHDL-apoE3-mediated ERK1/2 phosphorylation in these cells. Similarly, PI3K inhibition using the chemical inhibitor LY294002 markedly attenuated induction of HCAEC migration by rHDL-apoE3 and inhibited rHDL-apoE3-mediated phosphorylation of AKT and p38 MAPK in these cells. Chemical inhibition of PI3K did not affect eNOS phosphorylation by rHDL-apoE3 in HCAEC,

suggesting that a PI3K-independent mechanism is involved. siRNA-mediated gene silencing of the transcription factor ID1 markedly decreased induction of EA.hy926 cell migration by rHDL-apoE3 through inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation.

The overall findings this PhD Thesis indicate that rHDL-apoE3 affects a number of molecular mechanisms associated with atheroprotection. By focusing specifically on EC migration, it emerged that the MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/ eNOS-MMP2/9 and RHO-GTPases migration pathways, which are activated through ID1 overexpression, play a central role in this effect. Importantly, we demonstrated that these are the main mechanisms through which rHDL-apoE3 promotes human EC migration. Collectively, our findings support the heightened potential of rHDL-apoE3 to promote re-endothelialization and vascular endothelial repair following injury that may find clinical applications against ASCAD in the near future.

SUBJECT AREA: Pharmacogenomics, Biology of the Heart and Blood Vessels, Precision Medicine, Biological Drugs

KEYWORDS: Genomics, Biological drugs, Atherosclerosis, Cardiovascular disease, HDL, Apolipoprotein E3, Endothelial cell migration

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ | 17 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 20 |
| 1.1 Αθηροσκλήρωση | 20 |
| 1.1.1 Επιδημιολογία καρδιαγγειακής και στεφανιαίας νόσου | 20 |
| 1.1.2 Η παθογένεση της αθηροσκλήρωσης | 21 |
| 1.1.3 Ο ρόλος της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου στην αθηροσκλήρωση..... | 24 |
| 1.1.3.1 Οι λειτουργίες του ενδοθηλίου στο υγιές αρτηριακό τοίχωμα..... | 24 |
| 1.1.3.2 Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στην αθηροσκλήρωση..... | 25 |
| 1.1.4 Παράγοντες κινδύνου για τη αθηροσκληρωτική CAD | 26 |
| 1.1.5 Υπολιπιδαιμικά φάρμακα για ASCAD, θεραπευτική αποτελεσματικότητα και παρενέργειες..... | 27 |
| 1.2 Λιποπρωτεΐνες | 28 |
| 1.2.1 Δομή και βιολογικός ρόλος των λιποπρωτεϊνών | 28 |
| 1.2.2 Τα μονοπάτια μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών..... | 30 |
| 1.2.3 Το μεταβολικό μονοπάτι των HDL σωματιδίων | 33 |
| 1.2.3.1 Βιογένεση, αναδιαμόρφωση και καταβολισμός των HDL σωματιδίων..... | 33 |
| 1.2.3.2 Δομή HDL σωματιδίων..... | 36 |
| 1.2.3.3 Ετερογένεια HDL σωματιδίων..... | 38 |
| 1.2.3.4 Οι υποπληθυσμοί των HDL σωματιδίων..... | 40 |
| 1.2.3.5 Ο ρόλος της apoA-I στη βιογένεση της HDL..... | 42 |
| 1.2.3.5.1 Δομή και παραγωγή της apoA-I..... | 42 |
| 1.2.3.5.2 Βιογένεση HDL-apoA-I σωματιδίων..... | 43 |
| 1.2.3.6 Ο ρόλος της apoE στη βιογένεση της HDL..... | 43 |
| 1.2.3.6.1 Δομή και παραγωγή της apoE..... | 43 |
| 1.2.3.6.2 Βιογένεση HDL-apoE σωματιδίων..... | 46 |
| 1.3 Ο ρόλος της HDL στην αθηροσκλήρωση | 48 |
| 1.3.1 Η HDL προστατεύει από την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης | 48 |
| 1.3.2 Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL..... | 50 |
| 1.3.2.1 Η HDL επάγει την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης | 50 |
| 1.3.2.2 Η HDL επάγει την παραγωγή NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα..... | 54 |
| 1.3.2.3 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL..... | 57 |
| 1.3.2.3.1 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα..... | 57 |
| 1.3.2.3.2 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της HDL στα μονοκύτταρα..... | 60 |
| 1.3.2.3.3 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της HDL στα VSMCs..... | 61 |
| 1.3.2.3.4 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL in vivo..... | 61 |
| 1.3.2.4 Η αντιαποπρωτική δράση της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα..... | 62 |
| 1.3.2.5 Η HDL επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό..... | 64 |
| 1.3.2.5.1 Η HDL επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων..... | 64 |
| 1.3.2.5.2 Η HDL επάγει την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου in vivo..... | 65 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 1.3.2.5.3 | H HDL επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων..... | 66 |
| 1.3.2.5.4 | H HDL επάγει τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την επαγόμενη από υποξία αγγειογένεση..... | 66 |
| 1.3.2.6 | Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL..... | 67 |
| 1.3.2.7 | Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL..... | 69 |
| 1.4 | Η επίδραση της αθηροσκλήρωσης στη λειτουργικότητα της HDL..... | 72 |
| 1.4.1 | Μη λειτουργική/δυσλειτουργική HDL σε ασθενείς με CAD..... | 72 |
| 1.4.2 | Αλλαγές στην πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στη δυσλειτουργική HDL ασθενών με CAD..... | 74 |
| 1.5 | Ο ρόλος της apoE στην αθηροσκλήρωση..... | 76 |
| 1.5.1 | Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της apoE: Διαφορές σε δομή και λειτουργία - Συσχέτιση με δυσλιπιδαιμίες και CAD..... | 76 |
| 1.5.2 | Η apoE προστατεύει από την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης..... | 78 |
| 1.5.3 | Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της apoE μέσω ρύθμισης του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών..... | 80 |
| 1.5.4 | Η apoE επάγει εκροή χοληστερόλης και αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τα μακροφάγα..... | 82 |
| 1.5.5 | Αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της apoE που δε σχετίζονται άμεσα με την επίδρασή της στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών..... | 84 |
| 1.5.5.1 | Οι αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της apoE..... | 85 |
| 1.5.5.1.1 | Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα ενδοθηλιακά κύτταρα..... | 85 |
| 1.5.5.1.2 | Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα μονοκύτταρα και μακροφάγα..... | 85 |
| 1.5.5.1.3 | Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα T κύτταρα..... | 86 |
| 1.5.5.1.4 | Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα VSMCs..... | 87 |
| 1.5.5.2 | Η επίδραση της apoE σε λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων και στην αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό..... | 88 |
| 1.5.5.3 | Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της apoE..... | 88 |
| 1.5.5.4 | Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της apoE..... | 89 |
| 1.6 | Η HDL και η apoE αποτελούν θεραπευτικούς στόχους για την αθηροσκλήρωση..... | 89 |
| 1.6.1 | Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της ASCAD που στοχεύουν το μεταβολισμό και τη λειτουργικότητα της HDL..... | 89 |
| 1.6.1.1 | Θεραπευτικές προσεγγίσεις αύξησης της HDL-C έναντι της ASCAD: μηχανισμοί θεραπευτικής δράσης και αποτελεσματικότητα σε μείωση καρδιαγγειακού κινδύνου..... | 89 |
| 1.6.1.2 | Η λειτουργικότητα της HDL ως πρωταρχικός θεραπευτικός στόχος για την ASCAD έναντι των επιπέδων HDL-C..... | 92 |
| 1.6.1.3 | Ο αθηροπροστατευτικός ρόλος των πεπτιδίων μιμητών της apoA-I..... | 93 |
| 1.6.1.4 | rHDL-apoA-I σωματίδια και μείωση αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ASCAD..... | 94 |
| 1.6.1.4.1 | Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες των rHDL-apoA-I σωματιδίων..... | 94 |
| 1.6.1.4.2 | rHDL-apoA-I σωματίδια και μείωση καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ASCAD και πρόσφατο ACS..... | 95 |

| | |
|--|------------|
| 1.6.1.5 Μελλοντικές κατευθύνσεις για τη θεραπεία της ASCAD: νέες μορφές rHDL με βελτιωμένη πρωτεϊνική/λιπιδική σύσταση και ενισχυμένες αθηροπροστατευτικές λειτουργίες..... | 99 |
| 1.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της αθηροσκλήρωσης που στοχεύουν την apoE: πεπτίδια-μιμητές της apoE..... | 100 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 102 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 103 |
| 3.1 Έκφραση, παραγωγή και καθαρισμός της apoE3 με τη χρήση του ευκαρυωτικού συστήματος έκφρασης μέσω ανασυνδυασμένου αδενοϊού..... | 103 |
| 3.1.1 Κατασκευή ανασυνδυασμένου αδενοϊού που εκφράζει την apoE3 του ανθρώπου..... | 103 |
| 3.1.2 Παραγωγή της apoE3 με τη χρήση του ευκαρυωτικού συστήματος έκφρασης μέσω ανασυνδυασμένου αδενοϊού..... | 104 |
| 3.1.3 Καθαρισμός της παραγόμενης apoE3 με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και παρασκευή ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL που περιέχουν apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3)..... | 105 |
| 3.2 Έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-apoE3 σε βακτηριακό σύστημα E.Coli..... | 106 |
| 3.2.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.Coli με τον πλασμιδιακό φορέα pET32a-E3wt/3C..... | 106 |
| 3.2.2 Καλλιέργεια μικρής και μεγάλης κλίμακας των μετασχηματισμένων BL21-Gold (DE3) κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα «pET32a-E3wt/3C»..... | 108 |
| 3.3 Απομόνωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-apoE3 από τα κύτταρα έκφρασης BL21-Gold (DE3)..... | 110 |
| 3.4 Καθαρισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-apoE3 με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης Ni-NTA..... | 111 |
| 3.4.1 Εξισορρόπηση του πληρωτικού υλικού ρητίνης Ni-NTA με 5mM ιμιδαζόλιο.... | 111 |
| 3.4.2 Καθαρισμός της χιμαιρικής Trx-apoE3 με στήλη συγγένειας ρητίνης Ni-NTA... | 112 |
| 3.5 Αντίδραση αποκοπής της ετικέτας «Trx-6 His» από τη χιμαιρική πρωτεΐνη Trx-apoE3 μέσω της His-3C πρωτεάσης..... | 115 |
| 3.6 Απομόνωση της 34kDa apoE3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με στήλη ρητίνης Ni-NTA..... | 115 |
| 3.6.1 Εξισορρόπηση του πληρωτικού υλικού ρητίνης Ni-NTA με 5mM ιμιδαζόλιο.... | 116 |
| 3.6.2 Καθαρισμός της 34kDa apoE3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης με στήλη συγγένειας Ni-NTA..... | 116 |
| 3.7 Έκφραση της His-3C πρωτεάσης σε βακτηριακό σύστημα E.Coli..... | 119 |
| 3.8 Απομόνωση της His-3C πρωτεάσης από τα κύτταρα έκφρασης BL21-Gold (DE3)..... | 120 |
| 3.9 Καθαρισμός της His-3C πρωτεάσης με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης Ni-NTA..... | 121 |
| 3.10 Παρασκευή δισκοειδών ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL που περιέχουν apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3)..... | 123 |
| 3.10.1 Χημική αποδιάταξη της apoE3 παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης..... | 123 |
| 3.10.2 Παρασκευή σωματιδίων rHDL-apoE3..... | 124 |
| 3.11 Ποσοτικός προσδιορισμός της αναλογίας apoE3:φωσφολιπίδια στα σωματίδια rHDL-apoE3 και ποιοτικός έλεγχος του σχηματισμού τους..... | 126 |
| 3.12 Ποσοτικοποίηση συστατικών διαλύματος..... | 126 |

| | |
|--|-----|
| 3.12.1 Μέτρηση απορρόφησης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης..... | 126 |
| 3.12.2 Μέτρηση απορρόφησης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nano-Drop..... | 127 |
| 3.12.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Lowry..... | 128 |
| 3.12.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Bradford..... | 129 |
| 3.12.5 Προσδιορισμό φωσφολιπιδίων με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο..... | 130 |
| 3.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου..... | 131 |
| 3.13.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)..... | 131 |
| 3.13.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native PAGE)..... | 135 |
| 3.14 Απομόνωση HDL από ορό αίματος με το αντιδραστήριο θειϊκής δεξτράνης-χλωριούχου μαγνησίου..... | 136 |
| 3.15 Κυτταροκαλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου..... | 138 |
| 3.15.1 Κυτταροκαλλιέργεια των HAEC κυττάρων..... | 138 |
| 3.15.1.1 Ανακαλλιέργεια των HAEC κυττάρων..... | 139 |
| 3.15.1.2 Κατάψυξη και απόψυξη των HAEC κυττάρων..... | 139 |
| 3.15.2 Κυτταροκαλλιέργεια των HCAEC κυττάρων..... | 140 |
| 3.15.2.1 Ανακαλλιέργεια των HCAEC κυττάρων..... | 141 |
| 3.15.2.2 Κατάψυξη και απόψυξη των HCAEC κυττάρων..... | 141 |
| 3.15.3 Κυτταροκαλλιέργεια των EA.hy926 κυττάρων..... | 142 |
| 3.15.3.1 Ανακαλλιέργεια των EA.hy926 κυττάρων..... | 142 |
| 3.15.3.2 Κατάψυξη και απόψυξη των EA.hy926 κυττάρων..... | 143 |
| 3.16 Απομόνωση ολικού RNA, ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA..... | 144 |
| 3.16.1 Απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο Trizol..... | 144 |
| 3.16.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού RNA και έλεγχος της καθαρότητάς και ποιότητάς του..... | 145 |
| 3.17 Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής του RNA..... | 147 |
| 3.18 Ανάλυση ολικής γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες σε HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3..... | 149 |
| 3.19 Βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών και βιολογική ερμηνεία των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης (Data Mining)..... | 153 |
| 3.19.1 Βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών..... | 153 |
| 3.19.2 Εξόρυξη βιολογικών δεδομένων από τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών και βιολογική ερμηνεία των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης (Data Mining)..... | 154 |
| 3.19.2.1 Gene Ontology (GO) ανάλυση των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3..... | 154 |
| 3.19.2.2 IPA ανάλυση..... | 155 |
| 3.19.2.2.1 Η «Κεντρική Ανάλυση» του λογισμικού IPA..... | 155 |
| 3.19.2.2.2 Ανάλυση «Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών» του λογισμικού IPA..... | 157 |
| 3.19.2.2.3 «Ανάλυση Δικτύων» του λογισμικού IPA..... | 159 |

| | |
|--|-----|
| 3.19.2.2.4 Ανάλυση πρόβλεψης μεταγραφικών ρυθμιστών («Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών») του λογισμικού IPA..... | 160 |
| 3.19.2.3 Ανάλυση γονιδίων με τη διεθνή βάση δεδομένων του PubMed..... | 161 |
| 3.20 Πειράματα μεγάλης κλίμακας ποσοτικής PCR σε HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 για την επιβεβαίωση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών..... | 163 |
| 3.21 Επώαση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης..... | 166 |
| 3.21.1 Επώαση των HCAEC κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης..... | 166 |
| 3.21.2 Επώαση των EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης..... | 167 |
| 3.22 Λύση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων και απομόνωση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος..... | 168 |
| 3.23 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του συνόλου των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων..... | 169 |
| 3.24 Ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση western..... | 170 |
| 3.24.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)..... | 170 |
| 3.24.2 Ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ανοσοαποτύπωση western..... | 172 |
| 3.25 Επώαση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη κυτταρικής μετανάστευσης με τη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»..... | 176 |
| 3.25.1 Μελέτη μετανάστευσης στα HCAEC κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 με τη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»..... | 177 |
| 3.25.1.1 Πιλοτικά πειράματα εδραίωσης της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα..... | 177 |
| 3.25.1.2 Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3..... | 179 |
| 3.25.2 Μελέτη μετανάστευσης στα EA.hy926 κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 με τη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»..... | 180 |
| 3.25.2.1 Πιλοτικά πειράματα εδραίωσης και βελτιστοποίησης της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα EA.hy926 κύτταρα..... | 180 |
| 3.25.2.2 Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα EA.hy926 κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3..... | 181 |
| 3.26 Μονιμοποίηση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων και χρώση των πυρήνων με αιματοξυλίνη..... | 181 |
| 3.27 Μελέτη μετανάστευσης στα EA.hy926 κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 με τη δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης τύπου «Transwell»..... | 182 |
| 3.28 Πειράματα χημικής αναστολής των κινασών MEK1/2 και PI3K στα HCAEC κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-apoE3 για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης/φωσφορυλίωσης και της κυτταρικής μετανάστευσης..... | 184 |
| 3.28.1 Πιλοτικά πειράματα ελέγχου της λειτουργικότητας των χημικών αναστολέων των κινασών MEK1/2 και PI3K στα HCAEC κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις | |

| | |
|--|------------|
| και χρόνους επώασης..... | 184 |
| 3.28.2 Μελέτη της επίδρασης των χημικών αναστολέων των MEK1/2 και PI3K κινασών στην πρωτεϊνική έκφραση/φωσφορυλίωση στα HCAEC κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-αροΕ3 με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western..... | 186 |
| 3.28.3 Μελέτη της επίδρασης των χημικών αναστολέων των ERK1/2 και PI3K κινασών στη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων υπό έκθεση σε rHDL-αροΕ3 με δοκιμασίες προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»..... | 187 |
| 3.29 Πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-αροΕ3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης/φωσφορυλίωσης και κυτταρικής μετανάστευσης..... | 188 |
| 3.29.1 Πιλοτικά πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης των EFNΒ2 και ID1 στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα..... | 188 |
| 3.29.2 Επιμόλυνση των EA.hy926 κυττάρων με ID1 siRNA για 48h και 72h..... | 189 |
| 3.29.3 Ταυτόχρονη επιμόλυνση των EA.hy926 κυττάρων με ID1 siRNA για 72h ή 96h και έκθεση σε rHDL-αροΕ3 για 24h..... | 192 |
| 3.29.4 Επώαση των επιμολυσμένων με ID1 siRNA EA.hy926 κυττάρων με rHDL-αροΕ3 για τη μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης με δοκιμασίες προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»..... | 192 |
| 3.29.5 Επώαση των επιμολυσμένων με ID1 siRNA EA.hy926 κυττάρων με rHDL-αροΕ3 για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης/φωσφορυλίωσης με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western..... | 193 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 195 |
| 4.1 Έκφραση και απομόνωση της αροΕ3 του ανθρώπου σε βακτηριακό σύστημα E.Coli και καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας..... | 195 |
| 4.1.1 Έκφραση και απομόνωση της χημικικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων E.Coli..... | 195 |
| 4.1.2 Καθαρισμός της χημικικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου..... | 196 |
| 4.1.3 Απομόνωση της απαλλαγμένης από την ετικέτα θειορεδοξίνης-ιστιδίνης αροΕ3 με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου..... | 198 |
| 4.2 Έκφραση και απομόνωση της His-3C πρωτεΐνης σε σύστημα σε βακτηριακό σύστημα E.Coli και καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας..... | 201 |
| 4.2.1 Έκφραση και απομόνωση της His-3C πρωτεΐνης σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων E.Coli..... | 201 |
| 4.2.2 Καθαρισμός της His-3C πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου..... | 201 |
| 4.2.3 Έλεγχος δραστηριότητας της His-3C πρωτεΐνης στην πέψη της χημικικής Trx-αροΕ3..... | 203 |
| 4.3 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των δισκοειδών ανασυγκροτημένων HDL σωματιδίων που αποτελούνται από αροΕ3 και φωσφολιπίδια (rHDL-αροΕ3)..... | 204 |
| 4.3.1 Έλεγχος της δομικής ακεραιότητας και καθαρότητας της ελεύθερης λιπιδίων αναδιπλωμένης αροΕ3 και της αροΕ3 των rHDL-αροΕ3 σωματιδίων..... | 204 |
| 4.3.2 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος των rHDL-αροΕ3 σωματιδίων..... | 205 |
| 4.4 Η rHDL-αροΕ3 επάγει διακριτά προφίλ ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HCAEC κύτταρα..... | 210 |

| | |
|--|-----|
| 4.5 Η rHDL-αροΕ3 επηρεάζει γονίδια και βιολογικές λειτουργίες των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου και την αθηροσκλήρωση..... | 212 |
| 4.5.1 Στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα μετάγραφα των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3..... | 212 |
| 4.5.2 Gene Ontology (GO) ανάλυση με βάση την κυτταρική τοπολογία των πρωτεϊνικών προϊόντων των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3..... | 213 |
| 4.5.3 Βιολογικές και μοριακές λειτουργίες των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 με βάση την “Κεντρική Ανάλυση” IPA..... | 214 |
| 4.5.4 Ανάλυση δικτύων των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 με βάση την “Κεντρική Ανάλυση” IPA..... | 218 |
| 4.5.5 Ανάλυση πρόβλεψης μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3, με βάση την “Κεντρική Ανάλυση” IPA..... | 224 |
| 4.6 Η rHDL-αροΕ3 επάγει μεταγραφικές αλλαγές σε σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης των HAEC κυττάρων..... | 226 |
| 4.6.1 Ανάλυση των αλλαγμένων γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της βάσης δεδομένων PubMed..... | 226 |
| 4.6.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα.... | 227 |
| 4.6.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα..... | 232 |
| 4.6.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα.... | 236 |
| 4.6.5 Σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα..... | 240 |
| 4.6.6 Μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα..... | 246 |
| 4.7 Πειράματα επιβεβαίωσης των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών με qRT-PCR..... | 247 |
| 4.8 Η rHDL-αροΕ3 επάγει την πρωτεϊνική έκφραση γονιδίων-κλειδιών των μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα..... | 270 |
| 4.9 Η rHDL-αροΕ3 ενεργοποιεί σηματοδοτικά μόρια-τελεστές της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα..... | 273 |
| 4.10 Η rHDL-αροΕ3 επάγει τη μετανάστευση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων..... | 277 |
| 4.11 Η hHDL επάγει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων..... | 281 |
| 4.12 Μελέτη του ρόλου των κινασών MEK1/2 και PI3K στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων και ενεργοποίηση των σηματοδοτικών | |

| | |
|--|------------|
| μορίων-τελεστών που εμπλέκονται στα μονοπάτια μετανάστευσης των κυττάρων αυτών..... | 283 |
| 4.12.1 Έλεγχος της λειτουργικότητας των χημικών αναστολέων των κινασών MEK1/2 και PI3K στα HCAEC κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης..... | 283 |
| 4.12.2 Η rHDL-αροΕ3 επάγει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μέσω των μονοπατιών MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών..... | 288 |
| 4.12.3 Η rHDL-αροΕ3 ενεργοποιεί τις κινάσες ERK1/2, AKT και p38 MAPK στα HCAEC κύτταρα καθοδικά των MEK1/2 και PI3K, αντίστοιχα, ενώ η ενεργοποίηση της eNOS διεξάγεται ανεξάρτητα της PI3K..... | 294 |
| 4.13 Ταυτοποίηση γονιδίων-κλειδιών μέσω των οποίων η rHDL-αροΕ3 ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης και επάγει μετανάστευση στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα..... | 300 |
| 4.13.1 Πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης των γονιδίων ID1 και EFNΒ2 στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα..... | 300 |
| 4.13.2 Η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 εμποδίζει την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 στα EA.hy926 κύτταρα..... | 303 |
| 4.13.3 Η rHDL-αροΕ3 επάγει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων μέσω υπερέκφρασης του ID1..... | 306 |
| 4.13.4 Ο ID1 εμπλέκεται στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση των μονοπατιών μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών στα EA.hy926 κύτταρα..... | 308 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 311 |
| 5.1 Συζήτηση..... | 311 |
| 5.2 Περιορισμοί της μελέτης και μελλοντικά πειράματα..... | 326 |
| 5.3 Συμπεράσματα..... | 327 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ..... | 329 |
| ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ..... | 332 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 337 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 355 |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2014-2022 στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και στην Ιατρική Σχολή Αθηνών. Η διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την επιστημονική επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και συνεργαζόμενης Ερευνήτριας του ΙΙΒΕΑΑ, Δρ. Δέσποινας Σανούδου, την οποία και ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον, την ευχαριστώ για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκτεθώ σε διαφορετικά βιολογικά ερωτήματα αναπτύσσοντας την κριτική μου σκέψη και να ασχοληθώ με διαφορετικές πειραματικές τεχνικές. Την ευχαριστώ, επίσης, για την ευκαιρία που μου παρείχε να συνεργαστώ με αξιόλογους επιστήμονες και να συμμετάσχω σε πολλά επιστημονικά συνέδρια και στη συγγραφή επιστημονικών δημοσιεύσεων. Η κα Δ. Σανούδου μου δίδαξε, επίσης, πόσο σημαντικό είναι να δουλεύεις σκληρά για να πετύχεις τους στόχους σου, και όταν συναντάς δυσκολίες τότε να προσπαθείς ακόμη περισσότερο. Όλα αυτά τα χρόνια, με παρακινούσε να ξεπερνάω τις όποιες δυσκολίες συναντούσα, και μου έδινε ερεθίσματα να εξελισσομαι συνεχώς. Η θέληση και ο ενθουσιασμός που τη χαρακτηρίζει να διδάσκει στους φοιτητές τις συνεχώς εξελισσόμενες τεχνολογίες στη βασική και κλινική έρευνα, τους εφοδιάζει με κίνητρα και ερεθίσματα για μία μετέπειτα εξελικτική πορεία. Θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό που ήμουν ένας από αυτούς.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Δρ. Δημήτρη 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 την Δρ. Χρόνη Αγγελική, Ερευνήτρια Α΄ του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.ΚΕ.ΦΕ «Δημόκριτος» για τις πολύτιμες συμβουλές, τη συνεχή καθοδήγηση και τη συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής. Ευχαριστώ, επιπλέον, τον Δρ. Δ. Καρδάση για την επικοινωνιακή συνεργασία στα πλαίσια του *in vivo* project της rHDL-apoE3. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Δρ. Α. Χρόνη για την παροχή της πειραματικής τεχνολογίας που αφορούσαν εγκαθιδρυμένες μεθόδους του εργαστηρίου της, ειδικότερα την έκφραση και τον καθαρισμό της απολιποπρωτεΐνης E3 και την παρασκευή της rHDL-apoE3. Την ευχαριστώ θερμά που με δέχτηκε στο εργαστήριό της και συνέβαλε καθοριστικά στην εκπαίδευσή μου στις πειραματικές αυτές τεχνικές, καθώς και για την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών. Την ευχαριστώ, επίσης, για την παροχή της υλικοτεχνικής υποδομής (αντιδραστήρια, μηχανήματα κλπ.) που ήταν απαραίτητη για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Δρ. Χαράλαμπο Βλαχόπουλο, τον Καθηγητή Δρ. Κυριάκο Κυπραίο, τον Καθηγητή Δρ. Ευάγγελο Μανωλόπουλο και τον Καθηγητή Δρ. Ανδρέα Παπαπετρόπουλο, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην αξιολόγηση της διδακτορικής διατριβής και με τις στοχευμένες παρατηρήσεις τους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω τον Ομότιμο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Κρήτης και του Πανεπιστημίου της Βοστώνης Δρ. Βασίλη Ζαννή, ο οποίος μου παρείχε πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές σε όλη τη διάρκεια της διατριβής. Ευχαριστώ, επίσης, τον Δρ. Παναγιώτη Φωτάκη, πρώην μέλος του εργαστηρίου του Δρ. Β. Ζαννή, για την επικοινωνιακή συνεργασία μας στα πλαίσια της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα νυν και πρώην μέλη της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Δ. Σανούδου στο ΙΙΒΕΑΑ και στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και συναδελφικότητας που υπήρχε εντός των εργαστηρίων. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ τους Δρ. Λίζα Βαφειαδάκη, Δρ. Δημήτρη Αρβανίτη, Δρ. Ιωάννα Χαλατσά, Δρ. Χρίστο Τζήμα και Δρ. Γεωργία Καλοζούμη, οι οποίοι ήταν πρόθυμοι να συζητήσουν τις επιστημονικές μου ιδέες και να με συμβουλέψουν κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τη Δρ. Λίζα Βαφειαδάκη, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας στο ΙΙΒΕΑΑ. Η Λίζα ήταν πάντα εκεί, πρόθυμη και χαμογελαστή να συζητήσουμε τις ερευνητικούς μου προβληματισμούς και να με καθοδηγήσει πειραματικά. Με τη Λίζα μοιράστηκα τις ανησυχίες μου και τις καθημερινές μου στιγμές και με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια σε επιστημονικό αλλά και ψυχολογικό επίπεδο. Την ευχαριστώ γιατί εκτός του ότι είναι μία εξαιρετική ερευνήτρια που είχα τη χαρά να την έχω μέντορα, απέκτησα και μία καλή φίλη μέσα από αυτή την πολύχρονη διαδρομή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη Δρ. Ιωάννα Χαλατσά, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο ΙΙΒΕΑΑ και στην Ιατρική Σχολή, η οποία ήταν πάντα πρόθυμη να με συμβουλέψει επιστημονικά και να συζητήσουμε τις ερευνητικές μου σκέψεις. Την ευχαριστώ, επίσης, γιατί συνεχώς με ενθάρρυνε και με παρότρυνε να συνεχίσω αυτό το ταξίδι, καθώς και επειδή αποτέλεσε μία καλή φίλη καθόλη τη διάρκειά του.

Ευχαριστώ, επίσης, τη Δρ. Γεωργία Καλοζούμη που αποτέλεσε συνάδελφο, φίλη και συνοδοιπόρο στο μεγαλύτερο μέρος αυτής της διαδρομής, καθώς συνέπεσαν οι χρονικές περίοδοι των διδακτορικών μας. Με τη Γεωργία μοιραστήκαμε πολλές ερευνητικές ανησυχίες κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών, και εν τέλει χαρόμασταν και απογοητευόμασταν μαζί, ενθαρρύνοντας η μία την άλλη να συνεχίσει αυτό το ταξίδι.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαιτέρως, τα νυν και πρώην μέλη του εργαστηρίου της Δρ. Α. Χρόνη στο Δημόκριτο, και συγκεκριμένα τον Δρ. Ιωάννη Δάφνη, τη Δρ. Χριστίνα Γκολφινόπουλου, την υποψήφια διδάκτωρ Χριστίνα Μουντάκη και τη Δρ. Φαίη Σούκου για την πολύτιμη συμβολή τους στην εκπαίδευση μου σε εγκαθιδρυμένες πειραματικές μεθόδους του εργαστηρίου. Ευχαριστώ ιδιαίτερω τους Δρ. Ιωάννη Δάφνη και Δρ. Χριστίνα Γκολφινόπουλου για τις επιστημονικές τους συμβουλές, την καθοδήγηση και το ευχάριστο περιβάλλον εκπαίδευσης που μου παρείχαν. Τους ευχαριστώ γιατί εκτός του ότι ήταν εξαιρετικοί συνάδελφοι, απέκτησα και δύο καλούς φίλους μέσα από τη διαδρομή αυτή.

Ευχαριστώ τον Δρ. Δημήτρη Θεοφιλάτο, πρώην μέλος του εργαστηρίου του Δρ. Δ. Καρδάση, για τις συμβουλές του σε πειραματικές τεχνικές της διατριβής. Οι επιστημονικές μας συζητήσεις με βοήθησαν να λύνω απορίες και να βελτιώνω την κριτική μου σκέψη. Ευχαριστώ, επίσης, την υποψήφια διδάκτωρ Κατερίνα Δαλακούρα-Καραγκούνη του ιδίου εργαστηρίου για την εποικοδομητική συνεργασία μας στα πλαίσια του in vivo project.

Αυτή η πολυετής διαδρομή δε θα ήταν ίδια χωρίς τις αγαπημένες μου φίλες μου Κλεοπάτρα Τζωρτζάκη, Ευαγγελία Σωτηροπούλου, Μαρία Κουσκούνη, Ναυσικά Μαυρουδή και Μαρία Καλογιάννη, οι οποίες με στήριξαν και με ενθάρρυναν από την αρχή μέχρι το τέλος της διαδρομής αυτής. Τις ευχαριστώ γιατί μοιράστηκαν τα άγχη και τις αγωνίες μου, τις απογοητεύσεις αλλά και τις χαρούμενες στιγμές μου.

Κλείνοντας, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου για την κατανόηση, ηθική συμπαράσταση και πολυεπίπεδη υποστήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Παρά τη γεωγραφική απόσταση καταφέρνουν να είναι πάντα δίπλα μου και να στηρίζουν κάθε μου βήμα. Τέλος, ευχαριστώ την αδελφή μου Λένα που κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών αγκάλισε την αγωνία μου, ανέκτηκε τα ωράρια μου και με στήριξε σε πολλά επίπεδα με κατανόηση. Χωρίς τη βοήθεια και τη στηριξή τους, δε θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω το ταξίδι αυτό.

Η παρούσα έρευνα έχει χρηματοδοτηθεί από: 1) Τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας μέσω του Ερευνητικού Προγράμματος «ΘΑΛΗΣ» (κωδικός MIS 377286) του Επιχειρησιακού Προγράμματος “Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση” 2007-2013. 2) Το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος “Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση 2014-2020” στα πλαίσια του Ερευνητικού Προγράμματος «In vitro και in vivo αξιολόγηση της δράσης της ανασυσταμένης HDL που περιέχει απολιποπρωτεΐνη E3 κατά της αθηροσκλήρωσης (κωδικός MIS 5006782)». 3) Προσωπική υποτροφία (χρονικής διάρκειας 21 μηνών) για την εκπόνηση διδακτορικών σπουδών από το Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αθηροσκλήρωση

1.1.1 Επιδημιολογία καρδιαγγειακής και στεφανιαίας νόσου

Η καρδιαγγειακή νόσος (CVD, cardiovascular disease) περιλαμβάνει μία ευρεία ομάδα νοσημάτων που επηρεάζουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία, όπως η στεφανιαία νόσος (CAD, coronary artery disease), η εγκεφαλοαγγειακή νόσος, η καρδιακή ανεπάρκεια και οι μυοκαρδιοπάθειες. Η CVD είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), 73 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από CVD, η οποία ευθύνεται για 17,9 εκατομμύρια ετήσιους θανάτους παγκοσμίως που αντιστοιχούν στο 32% της παγκόσμιας θνησιμότητας [1, 2]. Στην Ευρώπη, η CVD προκαλεί 4,35 εκατομμύρια θανάτους ετησίως που αντιπροσωπεύουν το 45% της συνολικής θνησιμότητας, εκ των οποίων οι 1,4 εκατομμύρια θάνατοι συμβαίνουν σε ηλικία < των 75 ετών [3]. Στην Ελλάδα, η CVD προκαλεί το θάνατο σε ~ 50.000 άτομα ετησίως, εκ των οποίων τα 17.000 καταλήγουν από ισχαιμία του μυοκαρδίου (WHO Global Health Observatory data-Greece statistics summary (2002-present)). Σύμφωνα με τον WHO, εκτιμάται ότι η CVD θα ευθύνεται για 23,6 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως το 2030, αποτελώντας την πρώτη αιτία θνησιμότητας [1].

Η CAD είναι η πιο συχνή μορφή της CVD και μαζί με τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια ευθύνονται για το 85% των θανάτων που προκαλούνται από CVD [4]. Η CAD μπορεί να εκδηλωθεί κλινικά με μία από τις ακόλουθες μορφές: 1) ασυμπτωματική CAD επάγοντας ισχαιμία του μυοκαρδίου, 2) στηθάγχη που ταξινομείται σε σταθερή, ασταθής στηθάγχη και στηθάγχη τύπου Prinzmetal, 3) οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (AMI, acute myocardial infarction, γνωστό ως καρδιακή προσβολή), 4) αιφνίδιος θάνατος, και 5) καρδιακή ανεπάρκεια στα τελικά στάδια της νόσου. Η CAD αποτελεί την πρώτη αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως και ευθύνεται για 7,2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως [1]. Κάθε χρόνο στις ΗΠΑ, ~660.000 Αμερικανοί εμφανίζουν για πρώτη φορά στεφανιαίο επεισόδιο (MI ή θάνατο από CAD), ενώ ~305.000 άτομα το επανεμφανίζουν [4]. Ο επιπολασμός της CAD στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι θα αυξηθεί κατά 18% μέχρι το 2030 συγκριτικά με το 2013 [1]. Στην Ευρώπη, η CAD προκαλεί το θάνατο σε ~ δύο εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως [3]. Στην Ελλάδα, η CAD αποτελεί την κύρια αιτία θνησιμότητας, με περισσότερα από 15.000 νέα περιστατικά CAD να καταγράφονται ετησίως [5].

Παράλληλα με το τίμημα των CVD και CAD σε ανθρώπινες ζωές, σημαντικό είναι και το οικονομικό κόστος για τα συστήματα υγείας. Για παράδειγμα στις ΗΠΑ, οι δαπάνες

υγειονομικής περίθαλψης ασθενών με CVD και CAD ανέρχονται σε > 20 και 10,4 δισεκατομμύρια δολάρια, αντίστοιχα, ετησίως, ενώ εκτιμάται ότι θα αυξηθούν κατά 43% μέχρι το 2030 συγκριτικά με 2013 [4, 5].

Η απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών, οι οποίες αιματώνουν τον καρδιακό μυ, είναι η κύρια αιτία εμφάνισης της CAD. Ο σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας στις στεφανιαίες αρτηρίες προκαλεί στένωση, με αποτέλεσμα τη μειωμένη αιμάτωση του καρδιακού μυός. Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και ο επακόλουθος σχηματισμός θρόμβου αίματος οδηγεί στην απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών [6].

1.1.2 Η παθογένεση της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση είναι μία προοδευτική χρόνια φλεγμονώδης νόσος των μεγάλων και μεσαίων αρτηριών της συστηματικής κυκλοφορίας που ξεκινάει από τη νεαρή ηλικία, αλλά οι κλινικές της εκδηλώσεις παρουσιάζονται, συνήθως, κατά τη μέση ηλικία και αργότερα [7, 8]. Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος αποτελεί το εναρκτήριο βήμα της αθηροσκλήρωσης και προκαλείται από προφλεγμονώδους παράγοντες, όπως η συσσώρευση οξειδωμένων λιπιδίων στον έσω χιτώνα. Η διατάραξη της ενδοθηλιακής ακεραιότητας οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Ενότητα 1.1.3.2). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία επάγει την προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων από την κυκλοφορία στο αρτηριακό τοίχωμα η οποία σε συνδυασμό με τη συσσώρευση λιπιδίων στον έσω χιτώνα οδηγεί στην ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 1.1) [6, 7]. Η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από πάχυνση του τμήματος της αρτηρίας που βρίσκεται πιο κοντά στον αυλό λόγω συσσώρευσης λιπιδίων και ινώδους εντός της αθηρωματικής πλάκας, καθώς και από λέπτυνση των τοιχωμάτων της. Οι αλλαγές αυτές προκαλούν τη στένωση της αρτηρίας, η οποία οδηγεί σε μείωση της αιματικής ροής και επακόλουθη μειωμένη αιμάτωση της καρδιάς και του εγκεφάλου [9]. Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και ο επακόλουθος σχηματισμός θρόμβου στη στενωμένη αρτηρία μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη απόφραξη και, συνήθως, στην εμφάνιση σοβαρών κλινικών επιπλοκών, όπως οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS, acute coronary syndrome), AMI και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο [9, 10].

Η πορεία ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας μπορεί να διαχωριστεί σε τρία στάδια: 1) πρώιμες αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις, 2) αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις με “λιπαρές ραβδώσεις” και 3) ώριμες αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις (Εικόνα 1.1):

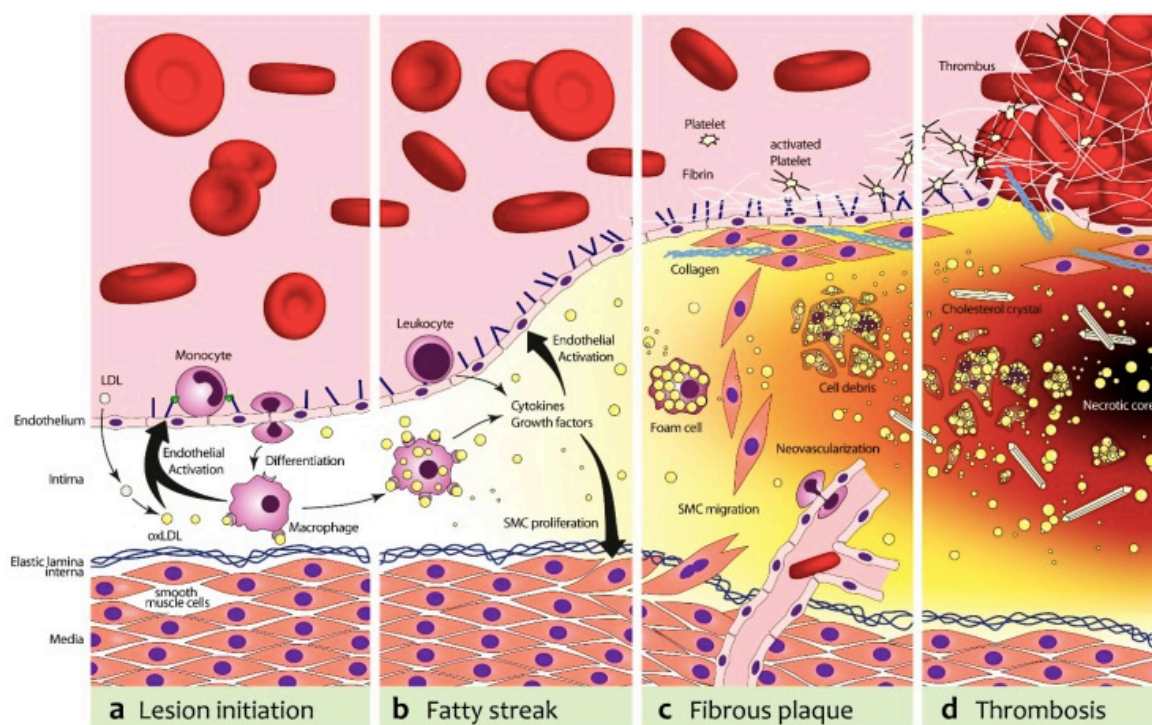
Πρώιμες αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις: Η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL, low density lipoprotein) από την κυκλοφορία του αίματος εισέρχεται στο υποενδοθηλιακό στρώμα του αρτηριακού τοιχώματος (έσω χιτώνα) μέσω παθητικής διάχυσης ή

διακυττάρωσης που μεσολαβείται από το μηχανισμό SR-BI (scavenger receptor class BI)-DOCK4 (dedicator of cytokinesis 4) [11]. Η LDL ακινητοποιείται στον έσω χιτώνα από τις πρωτεογλυκάνες που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπου και υφίσταται οξείδωση η οποία οδηγεί στο σχηματισμό οξειδωμένων σωματιδίων LDL (oxLDL, oxidized low density lipoprotein (LDL)) [12, 13]. Τα oxLDL σωματίδια επάγουν την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων που χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως το VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), το ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) και η Ρ-σελεκτίνη, καθώς και ποικίλων κυτταροκινών/χημειοκινών, όπως το MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) και η ιντερλευκίνη-8 (IL-8, interleukin 8). Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου οδηγεί στη χημειοταξία και τη μετανάστευση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα, όπου και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα [14].

Αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις που χαρακτηρίζονται από “λιπαρές ραβδώσεις (fatty streak lesions)”: Τα μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα προσλαμβάνουν τα oxLDL σωματίδια μέσω των υποδοχών CD36, SR-A (scavenger receptor class A) και LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1). Τα μακροφάγα δε μπορούν να καταβολίσουν περαιτέρω τα oxLDL σωματίδια, με αποτέλεσμα η συσσώρευση των σωματιδίων να οδηγεί στην αύξηση των εσωτερικών αποθεμάτων των μακροφάγων σε εστέρες χοληστερόλης και στην επακόλουθη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα αφρώδη κύτταρα εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1β, IL-6, TNF-α) ώστε να προσελκύσουν επιπλέον μονοκύτταρα και να επάγουν τη χημειοταξία των Τ λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο του αρτηριακού τοιχώματος [14]. Η αλληλεπίδραση της oxLDL με τα μονοκύτταρα επάγει επιγενετικές τροποποιήσεις ιστονών που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [15]. Τα συσσωρευμένα αφρώδη κύτταρα υφίστανται απόπτωση και νέκρωση που οδηγούν στην απελευθέρωση κυτταρικών υπολειμμάτων και κρυστάλλων χοληστερόλης στον έσω χιτώνα [16].

Ωριμες αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις: Τα αποπτωτικά κύτταρα και οι εναπόθεσεις λιπιδίων που συσσωρεύονται στον έσω χιτώνα σχηματίζουν έναν πυρήνα πλούσιο σε νεκρωτικό υλικό και λιπίδια [16]. Η φλεγμονώδης απόκριση μέσω της συσσώρευσης των Τ λεμφοκυττάρων επιδεινώνεται από τη μετανάστευση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (VSMCs, vascular smooth muscle cells) από τον μέσω στον έσω χιτώνα. Η μετανάστευση των VSMCs διευκολύνεται από την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας

μέσω των καθεψινών και μεταλλοπρωτεϊνάσων (MMPs, Matrix Metalloproteinases) που εκκρίνονται από τα αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα επάγουν, επίσης, τον πολλαπλασιασμό των VSMCs στον έσω χιτώνα. Τα VSMCs εκκρίνουν συστατικά εξωκυττάρια ουσίας σε μεγάλες ποσότητες, όπως το κολλαγόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ινώδους καλλύματος που περιβάλλει τον πλούσιο σε νεκρωτικό υλικό και λιπίδια πυρήνα. Ο σχηματισμός του νεκρωτικού πυρήνα που περιβάλλεται από το ινώδες κάλυμα σταθεροποιεί την αθηρωματική πλάκα [17]. Οι ασταθείς αθηρωματικές πλάκες χαρακτηρίζονται από μεγάλο μεγέθους νεκρωτικό πυρήνα (> 40% του όγκου της πλάκας) με λεπτό ινώδες κάλυμα, το οποίο στερείται VSMCs και κολλαγόνο, και διηθείται από προφλεγμονώδη κύτταρα (μονοκύτταρα/μακροφάγα και ουδετερόφιλα). Ο νεκρωτικός πυρήνας των ασταθών αθηρωματικών πλακών αποτελείται από κρυστάλλους και εστέρες χοληστερόλης, οξειδωμένα λιπίδια, ινώδες, ερυθροκύτταρα, υπολείμματα ερυθροκυττάρων και αποπτωτικά μακροφάγα [18]. Η νεοαγγείωση και η επακόλουθη αιμορραγία από τα μικρά νεοσχηματιζόμενα αγγεία στην αθηρωματική πλάκα, ο σχηματισμός κρυστάλλων χοληστερόλης, η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, καθώς και η αυξημένη ενεργότητα πρωτεασών που εκκρίνονται από τα αφρώδη κύτταρα συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση της πλάκας. Οι μηχανισμοί αυτοί οδηγούν στη ρήξη της ασταθούς αθηρωματικής πλάκας και στην επακόλουθη θρόμβωση [18, 19].



Εικόνα 1.1: Τα στάδια ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας: α) πρώιμες αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις, β) αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις με “λιπαρές ραβδώσεις”, γ)

αθηρωματικές πλάκες με νεκρωτικό πυρήνα που περιβάλλεται από ινώδες κάλλυμα, δ) ασταθείς αθηρωματικές πλάκες - με μεγάλο μεγέθους νεκρωτικό πυρήνα που περιβάλλεται από λεπτό ινώδες κάλλυμα - υπό ρήξη και επακόλουθη θρόμβωση [19].

1.1.3. Ο ρόλος της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου στην αθηροσκλήρωση

1.1.3.1 Οι λειτουργίες του ενδοθηλίου στο υγιές αρτηριακό τοίχωμα

Το αγγειακό ενδοθήλιο είναι ένα ενιαίο μονόστοιβο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων τοποθετημένο πάνω σε μία βασική μεμβράνη εξωκυττάριας ουσίας το οποίο οριοθετεί τον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος και καλύπτει την επιφάνεια του αυλού (εσωτερική κοιλότητα) των αρτηριών [7] [20]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του έσω χιτώνα σχηματίζουν ένα επιλεκτικά διαπερατό φράγμα μεταξύ του περιφερικού αίματος στην εσωτερική επιφάνεια του αυλού και του υποενδοθηλιακού χώρου του αρτηριακού τοιχώματος. Επιπροσθέτως, το ενδοθήλιο συνθέτει και εκκρίνει ένα εύρος βιολογικά ενεργών διαμεσολαβητών (αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες, πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, κ.α.) που ρυθμίζουν τοπικά μία σειρά λειτουργιών, όπως την ενδοθηλιακή διαπερατότητα, τον αγγειακό τόνο, τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, την αγγειογένεση, τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, κ.α. [21, 22]. Η εκκριτική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζεται από μία πληθώρα ερεθισμάτων, όπως αιμοδυναμικές δυνάμεις (shear stress), λιποπρωτεΐνες, ορμόνες και κυτταροκίνες. Η δομική και λειτουργική ακεραιότητα του ενδοθηλίου ρυθμίζεται από κυτταρικούς συνδέσμους διακυτταρικής επικοινωνίας και κυτταρικής πρόσδεσης, όπως σύνδεσμοι και εστίες προσκόλλησης και δεσμοσώματα [23]. Η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοθηλίου είναι απαραίτητη για ένα υγιές αγγειακό σύστημα [24].

Στο υγιές αρτηριακό τοίχωμα, το ενδοθήλιο ρυθμίζει τοπικά τον αγγειακό τόνο και συμβάλλει στη δυναμική διατήρησή του μέσω σύνθεσης και απελευθέρωσης αγγειοδραστικών ουσιών. Επιπροσθέτως, το ενδοθήλιο εμποδίζει την προσκόλληση και μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα, και καταστέλλει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των VSMCs σε αυτόν. Επιπλέον, το ενδοθήλιο έχει αντιθρομβωτική λειτουργία, καθώς εμποδίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη θρόμβωση [21, 22]. Όλες αυτές οι λειτουργίες του ενδοθηλίου μεσολαβούνται κυρίως μέσω του μονοξειδίου του αζώτου (NO, nitric oxide), ενός αγγειοδιασταλτικού μορίου που παράγεται από την ενδοθηλιακή συνθετάση του NO (eNOS, endothelial nitric oxide synthase) μέσω μετατροπής της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη, και έπειτα διαχέεται μέσω της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα γειτονικά κύτταρα [22]. Δύο κύριοι

μηχανισμοί δράσης εμπλέκονται στη λειτουργία του NO: 1) Το NO ενεργοποιεί τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση και οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυτταρικής κυκλικής μονοφωσφορικής γουανωσίνης (cGMP, cyclic guanosine monophosphate) στα γειτονικά VSMCs, με αποτέλεσμα τη χαλάρωση των VSMCs και την επακόλουθη αγγειοδιαστολή. Η ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης οδηγεί, επίσης, σε μειωμένη προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, ενώ εμποδίζει την ενεργοποίηση, προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. 2) Το NO επάγει την s-νιτροζυλίωση στα κατάλοιπα κυστεΐνης ενός εύρους πρωτεϊνών στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια (όπως, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ που ρυθμίζει τη φλεγμονή, οι πρωτεΐνες ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παραγωγή του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) από τα αιμοπετάλια), και με αυτό τον τρόπο οδηγεί στην απενεργοποίησή τους. Ο μηχανισμός αυτός, προσδίδει στο NO αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες [22] [24, 25]. Εκτός από την παραγωγή NO, το ενδοθήλιο επάγει αγγειοδιαστολή μέσω έκκρισης της προστακυκλίνης (PGI₂, prostaglandin I₂). Επίσης, το ενδοθήλιο εμφανίζει αντιθρομβωτικές και ινωδολυτικές ιδιότητες μέσω έκκρισης αναστολέων της συσσώρευσης και συγκόλλησης των αιμοπεταλίων επιπρόσθετων του NO, όπως η PGI₂, καθώς και άλλων μεσολαβητών, όπως η θρομβομοντουλίνη, ο ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου (t-PA, tissue plasminogen activator), η ουροκινάση, κ.α. [22].

1.1.3.2 Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στην αθηροσκλήρωση

Η διατάραξη της ενδοθηλιακής ακεραιότητας (τραυματισμός του ενδοθηλίου) του αρτηριακού τοιχώματος οδηγεί στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [22]. Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου και η επακόλουθη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία επάγεται από ποικίλους προαθηρογόνους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, όπως η υπερχοληστερολαιμία, η υπερτριγλυκεριδαιμία, η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση και το κάπνισμα [26-28]. Η δυσλειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου χαρακτηρίζεται από μειωμένη αγγειοδιαστολή, αυξημένο οξειδωτικό στρες, απόπτωση, χρόνια φλεγμονή, μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων στον έσω χιτώνα, προθρομβωτικές ιδιότητες, γήρανση και διαταραγμένο μεταβολισμό [21] [29]. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ή η βλάβη στους μηχανισμούς αποκατάστασης του τραυματισμένου ενδοθηλίου μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και στην εμφάνιση των κλινικών επιπλοκών της νόσου [24]. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη κινδύνου νέων καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς με προυπάρχουσα CVD [30-32]. Η αύξηση της διαπερατότητας του τραυματισμένου ενδοθηλίου του αρτηριακού

τοιχώματος οδηγεί στη συσσώρευση oxLDL σωματιδίων στον έσω χιτώνα, τα οποία επάγουν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω των εξής μηχανισμών: 1) Εμποδίζουν την παραγωγή NO, και επακόλουθα τις αθηροπροστατευτικές του δράσεις στο αρτηριακό τοίχωμα (VSMCs) και στα περιφερικά κύτταρα (λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια) (Ενότητα 1.1.3.1), είτε μέσω καταστολής της ενεργοποίησης της eNOS ή μέσω επαγωγής της αποικοδόμησης του NO [33]. 2) Επάγουν την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την επακόλουθη φλεγμονώδη απόκριση μέσω ενεργοποίησης του NF-κΒ, οδηγώντας στην υπερέκφραση της NADPH οξειδάσης 1 (NOX-1, NADPH Oxidase 1), των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1, του MCP-1 και άλλων προφλεγμονωδών χημειοκινών [24]. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν στην παραγωγή δραστικών μορφών αναγωγής του οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη μετανάστευση των μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα. Η παραγωγή ROS συμβάλει στη μείωση της παραγωγής NO και στην ενεργοποίηση του NF-κΒ επάγοντας φλεγμονώδη απόκριση. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παράγονται από τα μακροφάγα-αφρώδη κύτταρα επάγουν περαιτέρω φλεγμονώδη απόκριση μέσω χημειοταξίας των T λεμφοκυττάρων [30]. Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου του έσω χιτώνα οδηγεί, επίσης, στην εμφάνιση προθρομβωτικών ιδιοτήτων είτε μέσω σύνθεσης της εκκρινόμενης θρομβοξάνης A2 (TxA2, Thromboxane A2), η οποία επάγει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, ή μέσω έκφρασης μορίων-συμπαράγοντων που μεσολαβούν στην ενεργοποίηση ή/και συγκόλληση των αιμοπεταλίων (όπως, ο παράγοντας von Willebrand (vWF), η φμπρονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη), ή προπηκτικών παραγόντων/παραγόντων πήξης (όπως ο παράγοντας πήξης V). Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου οδηγεί, επίσης, σε μειωμένη έκφραση αντιθρομβωτικών μορίων. Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τους προθρομβωτικούς μεσολαβητές: 1) TF, ο οποίος ενεργοποιεί τον καταρράκτη πήξης του αίματος που σχηματίζει το πλέγμα του ινώδους, και 2) αναστολέα του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου τύπου 1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1), ο οποίος εμποδίζει το μονοπάτι ινωδόλυσης [22]. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν στο σχηματισμό θρόμβου στο αρτηριακό τοίχωμα (Εικόνα 1.1).

1.1.4 Παράγοντες κινδύνου για τη αθηροσκληρωτική CAD

Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου, καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, εμπλέκονται στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, της CVD και της CAD [34-37]. Η αθηροσκλήρωση σχετίζεται με διαταραχή των φυσιολογικών επιπέδων των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών. Οι δυσλιπιδαιμίες (υπερχοληστερολαιμία ή/και υπερτριγλυκεριδαιμία) και ειδικότερα τα

υψηλά επίπεδα της LDL χοληστερόλης (LDL-C, LDL cholesterol), των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών (χυλομικρά και VLDL) και των υπολειμμάτων τους στο πλάσμα αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες υψηλού κινδύνου για αθηροσκληρωτική CVD (ASCVD, atherosclerotic CVD) και CAD (ASCAD, atherosclerotic CAD) [36] [38]. Τα χαμηλά επίπεδα της HDL (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, high density lipoprotein) χοληστερόλης (HDL-C, HDL cholesterol) στο πλάσμα και η μειωμένη συγκέντρωση των HDL σωματιδίων υποπληθυσμού α1 και α2 έχουν, επίσης, συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρώιμης ASCAD, ανεξάρτητα από τα επίπεδα LDL-C και τριγλυκεριδίων του πλάσματος, το σωματικό βάρος ή την παρουσία διαβήτη. Συνεπώς, τα χαμηλά επίπεδα της HDL-C του πλάσματος αποτελούν ισχυρό δείκτη κινδύνου για την ανάπτυξη πρώιμης ASCAD [37] [39]. Επιπροσθέτως, η γενετική προδιάθεση και το οικογενειακό ιστορικό πρώιμης CAD, η υπέρταση, η ηλικία, ο σακχαρώδης διαβήτης, το μεταβολικό σύνδρομο, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, οι διατροφικές συνήθειες, η έλλειψη σωματικής άσκησης και το άγχος συνδέονται με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης CVD ή CAD [34, 35].

1.1.5 Υπολιπιδαιμικά φάρμακα για ASCAD, θεραπευτική αποτελεσματικότητα και παρενέργειες

Η μείωση των επιπέδων της LDL-C στο πλάσμα αποτελεί τον πρωταρχικό θεραπευτικό στόχο για την πρόληψη και θεραπεία της ASCAD. Τα κλινικά διαθέσιμα φάρμακα που χορηγούνται σε ασθενείς με ASCAD για τη μείωση της LDL-C περιλαμβάνουν τους αναστολείς της HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) αναγωγάσης (στατίνες), την εζετιμίδη και τους αναστολείς του ενζύμου PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9). Οι φιβράτες και η νιασίνη χορηγούνται για τη μείωση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος. Τα φάρμακα αυτά μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε μεγάλο ποσοστό ασθενών, ωστόσο ο καρδιαγγειακός κίνδυνος παραμένει, με αποτέλεσμα το 30% των ασθενών που λαμβάνει υπολιπιδαιμική αγωγή να εμφανίζει ένα νέο στεφανιαίο επεισόδιο [40, 41]. Για παράδειγμα, οι στατίνες, οι οποίες χορηγούνται σε > το 90% των ασθενών, μειώνουν σημαντικά τα καρδιαγγειακά συμβάματα και τη θνησιμότητα κατά 25-30%. Ωστόσο, ο κίνδυνος εμφάνισης ενός νέου στεφανιαίου επεισοδίου σε υψηλού κινδύνου ασθενείς που λαμβάνουν στατίνες φτάνει το 12%-22%, παρά τη σημαντική μείωση της LDL-C [41-44]. Τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα εκτός του ότι δεν είναι επαρκώς αποτελεσματικά στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου, χαρακτηρίζονται από σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η διαφορική ανταπόκριση των ασθενών στη μείωση της LDL-C και οι παρενέργειες, τα οποία συχνά οδηγούν σε διακοπή της φαρμακευτικής αγωγής [40, 41]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι στατίνες, οι οποίες μειώνουν την LDL-C

κατά 18-55% [45]. Ωστόσο, οι στατίνες επιτυγχάνουν την επιθυμητή μείωση της LDL-C μόνο στο 37% των ασθενών, με αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα LDL-C να παραμένουν σε μεγάλο ποσοστό ασθενών, παρά τη συμμόρφωσή τους στην αγωγή με στατίνες [46, 47]. Επιπροσθέτως, σημαντικό ποσοστό ασθενών εμφανίζουν μερικώς ή πλήρη δυσανεξία (μη ανοχή) στις στατίνες που συνοδεύεται από παρενέργειες (πχ. μυαλγίες, μυϊκή αδυναμία, μυοσίτιδα, ραβδομύλυση, διαβήτη τύπου-II και οξεία νεφρική ανεπάρκεια) [41] [46]. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη νέων βελτιωμένων και αποτελεσματικότερων θεραπειών.

Το μεταβολικό μονοπάτι της HDL, ένα μακρομοριακό σύμπλοκο πρωτεϊνών και λιπιδίων, αποτελεί φαρμακολογικό στόχο για τη θεραπεία και πρόληψη της ASCAD [48]. Η αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων HDL-C στο πλάσμα και του κινδύνου εμφάνισης πρώιμης ASCAD σε συνδυασμό με τις ποικίλες αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL οδήγησαν στην ανάπτυξη εύρους θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν στη βελτίωση της λειτουργικότητας της HDL και στην αύξηση των επιπέδων της HDL-C (Ενότητα 1.6.1) [49, 50]. Οι προσεγγίσεις αυτές βρίσκονται σε στάδιο προκλινικών και κλινικών μελετών με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [51].

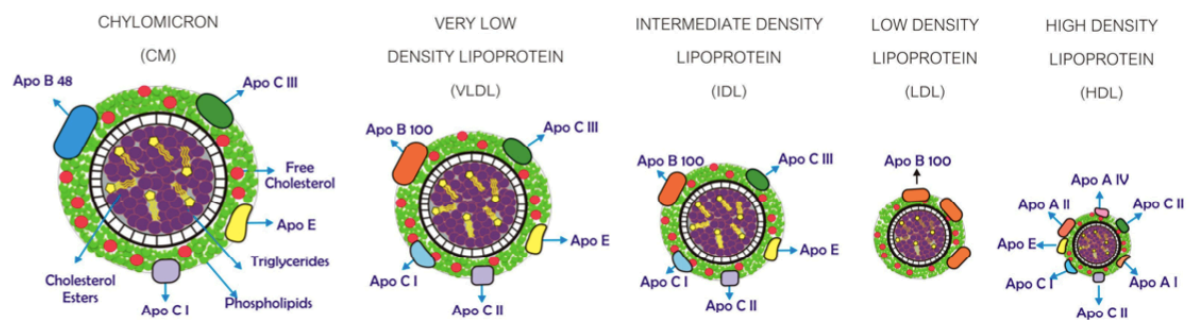
1.2 Λιποπρωτεΐνες

1.2.1 Δομή και βιολογικός ρόλος των λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά σύμπλοκα λιπιδίων και πρωτεϊνών που λειτουργούν ως μεταφορείς λιπιδίων του πλάσματος στους διάφορους ιστούς του σώματος. Οι κύριες δομικές απολιποπρωτεΐνες (apolipoproteins, apo) των λιποπρωτεϊνών είναι οι apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoB-100, apoB-48, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE και apoM (Εικόνα 1.2). Η βασική δομή των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων είναι σφαιρική στην οποία οι απολιποπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια και την ελεύθερη χοληστερόλη, και σχηματίζουν το πολικό (υδρόφιλο) εξωτερικό τμήμα των σωματιδίων (φλοιός). Ο φλοιός περιβάλλει ένα μη πολικό (υδρόφοβο) πυρήνα που αποτελείται από τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης (Εικόνα 1.2). Οι απολιποπρωτεΐνες δεν έχουν μόνο δομικό ρόλο σταθεροποιώντας το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο αλλά και λειτουργικό, καθώς συμμετέχουν σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών. Κάποιες απολιποπρωτεΐνες συντελούν στην αναγνώριση και σύνδεση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων στους εξειδικευμένους υποδοχείς (πχ. apoE και apoB-100) ή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά λιπιδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Επιπλέον, κάποιες απολιποπρωτεΐνες ενεργοποιούν ή αναστέλλουν ειδικά ένζυμα που συμμετέχουν στο

μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, καθώς δρουν ως συνένζυμα (π.χ. apoA-I και apoC-II) στις αντιδράσεις που καταλύονται από αυτά [52, 53].

Η σύνθεση και η αναλογία των λιπιδίων ως προς τις πρωτεΐνες σε κάθε λιποπρωτεΐνη καθορίζει το μέγεθος και την πυκνότητά της. Το μέγεθος κάθε λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου είναι αντιστρόφως ανάλογο με την πυκνότητά του. Με βάση την πυκνότητά τους (d , density), η οποία αποτελεί την αρχή διαχωρισμού τους με υπερφυγοκέντρηση, οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται στις εξής πέντε κατηγορίες (χαμηλότερη προς υψηλότερη πυκνότητα): 1) χυλομικρά (chylomicrons, CM), 2) πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (very low density lipoproteins, VLDL), 3) ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (intermediate density lipoproteins, IDL), 4) χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low density lipoproteins, LDL) και 5) υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (high density lipoproteins, HDL). Κάθε κατηγορία λιποπρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από διακριτή σύσταση λιπιδίων και αποτελείται από χαρακτηριστικές απολιποπρωτεΐνες (Πίνακας 1.1, Εικόνα 1.2) [53, 54].



Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση των λιποπρωτεϊνών χυλομικρά, VLDL, IDL, LDL και HDL με βάση την απολιποπρωτεϊνική και λιπιδική τους σύσταση και τη διάμετρο (μέγεθος) [54].

Πίνακας 1.1 : Κατηγοριοποίηση των λιποπρωτεϊνών σε χυλομικρά, VLDL, IDL, LDL και HDL με βάση την πυκνότητα, τη διάμετρο και την πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση (τροποποιημένος από: [53]).

| | Chylomicrons | VLDL | IDL | LDL | HDL |
|--------------------------|--------------------------|------------|-------------|-------------|------------|
| Density (g/ml) | <0.94 | 0.94-1.006 | 1.006-1.019 | 1.019-1.063 | 1.063-1.21 |
| Diameter. (nm) | 75-1200 | 30-80 | 25-50 | 18-30 | 5-12 |
| | <u>Components</u> | | | | |
| Protein (%) | 1-2 | 6-10 | 18 | 18-20 | 45-55 |
| FC (%) | 1-3 | 4-8 | 29 | 6-8 | 3-5 |
| CE (%) | 2-4 | 16-22 | 32-35 | 45-50 | 15-20 |
| PL (%) | 3-6 | 15-20 | 22 | 18-24 | 26-32 |
| TG (%) | 80-95 | 45-65 | 31 | 4-8 | 2-7 |

1.2.2 Τα μονοπάτια μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών

Η επιτυχής μεταφορά των λιπιδίων του πλάσματος και η επακόλουθη διανομή τους στους διάφορους ιστούς του σώματος επιτυγχάνεται με διαδοχικούς κύκλους βιοσύνθεσης και καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών. Απολιποπρωτεΐνες, εξειδικευμένα ένζυμα πλάσματος, πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων και υποδοχείς λιποπρωτεϊνών συμμετέχουν στα διάφορα στάδια μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών. Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών μεσολαβείται μέσω τριών διακριτών μονοπατιών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους: 1) το μονοπάτι των χυλομικρών, 2) το μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL σωματιδίων και 3) το μονοπάτι των HDL σωματιδίων (Εικόνα 1.3) [53].

Το μονοπάτι των χυλομικρών: μέσω αυτού του μονοπατιού τα λιπίδια που προσλαμβάνονται από τις τροφές μεταφέρονται από το λεπτό έντερο στους περιφερικούς ιστούς. Τα χυλομικρά αποτελούν την κύρια μορφή μεταφοράς στο πλάσμα των τριγλυκεριδίων που προσλαμβάνονται εξωγενώς. Τα χυλομικρά βιοσυντίθενται στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου από τα λιπίδια που προσλαμβάνονται από την τροφή και τις apoA-I και apoB-48. Τα λιπαρά οξέα και η χοληστερόλη που προσλαμβάνονται εξωγενώς μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου όπου και τροποποιούνται, ώστε να σχηματίσουν τα τριγλυκερίδια και τους εστέρες χοληστερόλης, αντίστοιχα. Τα λιπίδια αυτά συνδέονται με την apoB-48 παράγοντας τα χυλομικρά στην ανώριμη μορφή τους, τα οποία εκκρίνονται από το εντερικό επιθήλιο στην

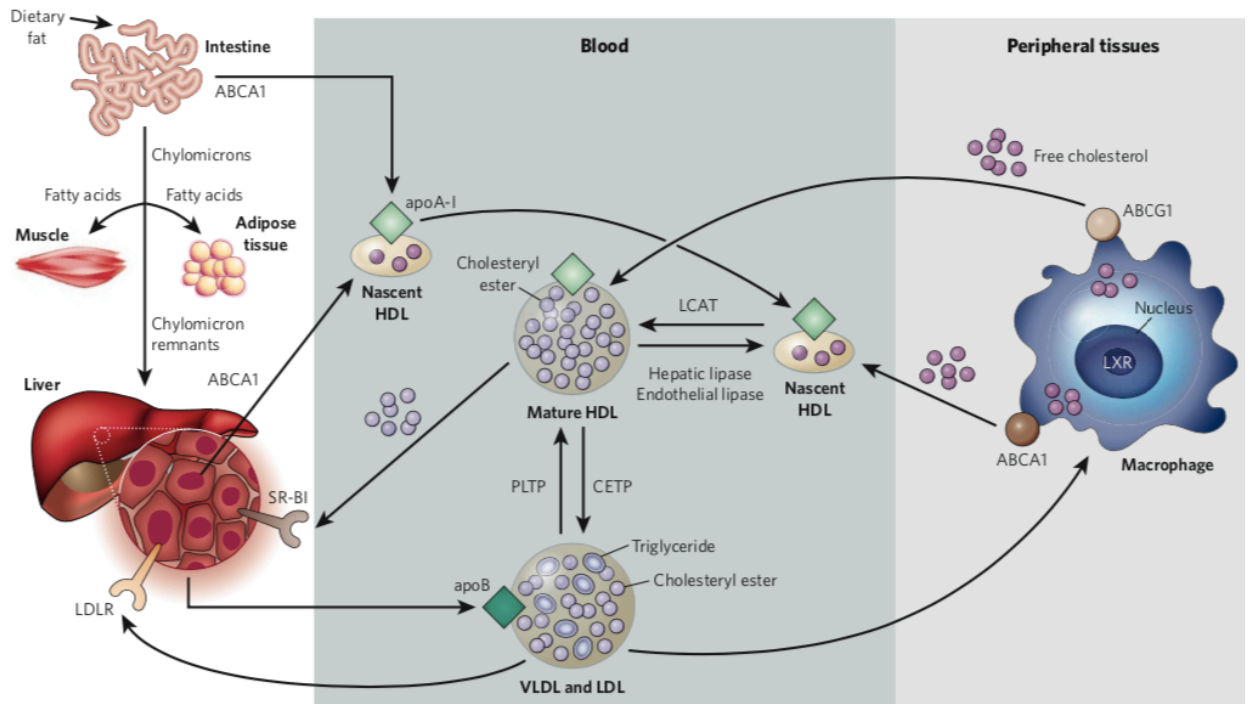
κυκλοφορία του αίματος. Μετά την είσοδό τους στην κυκλοφορία, τα ανώριμα χυλομικρά προσλαμβάνουν από τα HDL σωματίδια εστέρες χοληστερόλης και τις apoC-II, apoC-III και apoE, αποδίδοντας παράλληλα στα σωματίδια αυτά την apoA-I και φωσφολιπίδια. Με τον τρόπο αυτό, τα ανώριμα χυλομικρά μετατρέπονται στη μεταβολικά ώριμη μορφή τους, η οποία αναγνωρίζεται από το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL, lipoprotein lipase). Η LPL υδρολύει τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών προς γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία απορροφούνται από το λιπώδη και μυϊκό ιστό. Μέσω της δράσης της LPL, τα χυλομικρά μικραίνουν σε μέγεθος, ενώ παράλληλα μέρος από τη χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια, καθώς και οι apoA-I, apoC-II και apoC-III μεταφέρονται στα HDL σωματίδια. Τα εναπομείνοντα σωματίδια, τα οποία ονομάζονται υπολείμματα χυλομικρών (chylomicron remnants), μεταφέρονται στο ήπαρ όπου και καταβολίζονται διαμέσου των υποδοχέων των ηπατοκυττάρων που αναγνωρίζουν την apoE, τον LRP (LDL-receptor-related protein) και τον LDLR (LDL receptor, υποδοχέας της LDL). Με αυτόν τον τρόπο, τα υπολείμματα χυλομικρών απομακρύνονται από την κυκλοφορία [53].

Το μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL σωματιδίων: μέσω αυτού του μονοπατιού τα λιπίδια που βιοσυντίθενται στο ήπαρ μεταφέρονται στους περιφερικούς ιστούς. Τα VLDL σωματίδια αποτελούν την κύρια μορφή μεταφοράς στο πλάσμα των τριγλυκεριδίων που βιοσυντίθενται ενδογενώς. Τα VLDL σωματίδια παράγονται στο ήπαρ από τριγλυκερίδια, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, καθώς και τις apoB-100 και apoE. Τα τριγλυκερίδια και μικρές ποσότητες εστεροποιημένης χοληστερόλης μεταφέρονται από τα σημεία βιοσύνθεσής τους στις περιοχές του ενδοπλασματικού δικτύου των ηπατοκυττάρων, όπου βρίσκεται η νεοσυντεθείσα apoB-100 με την οποία συνδέονται οδηγώντας στο σχηματισμό των VLDL σωματιδίων. Τα VLDL σωματίδια είναι, επίσης, πλούσια σε τριγλυκερίδια αλλά χαρακτηρίζονται από υψηλότερη αναλογία χοληστερόλης προς τριγλυκερίδια σε σχέση με τα χυλομικρά. Μετά τη βιοσύνθεσή τους, τα VLDL σωματίδια εκκρίνονται από το ηπατοκύτταρο στο πλάσμα και προσλαμβάνουν τις apoC-II, apoC-III και apoE από τα HDL σωματίδια. Τα τριγλυκερίδια των VLDL σωματιδίων υδρολύονται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα μέσω της LPL, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στα κύτταρα του λιπώδους και μυϊκού ιστού και στα ηπατοκύτταρα. Με την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, τα VLDL σωματίδια μετατρέπονται σε μικρότερου μεγέθους και πυκνότερα σωματίδια, τα οποία ονομάζονται υπολείμματα VLDL (VLDL remnants). Ένα μέρος των υπολειμμάτων VLDL απομακρύνεται από την κυκλοφορία και καταβολίζονται στο ήπαρ μέσω του υποδοχέα των VLDL των ηπατοκυττάρων και των ηπατικών υποδοχέων LRP και LDLR, οι οποίοι αναγνωρίζουν την apoE που φέρουν στην επιφάνειά τους. Η μεγαλύτερη όμως ποσότητα των υπολειμμάτων

VLDL συνεχίζουν να αποικοδομούνται στο πλάσμα με τη δράση της LPL μέσω υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό IDL σωματιδίων από τα υπολείμματα VLDL. Ένα μέρος από τα IDL σωματίδια καταβολίζεται στο ήπαρ μέσω των ηπατικών υποδοχέων LRP και LDLR, και με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται από την κυκλοφορία. Η μεγαλύτερη όμως ποσότητα των IDL σωματιδίων στο πλάσμα μετατρέπεται σε πλούσια σε χοληστερόλη LDL σωματίδια μέσω υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων από την ηπατική λιπάση (HL, hepatic lipase). Κατά τη μετατροπή αυτή, μεταφέρονται οι apoC-II, apoC-III και apoE από τα IDL στα HDL σωματίδια. Παράλληλα, τα IDL σωματίδια παραλαμβάνουν από τα HDL σωματίδια εστέρες χοληστερόλης σε ανταλλαγή με τριγλυκερίδια με τη δράση της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CEPT, cholesterol ester transfer protein). Ο ρόλος των LDL σωματιδίων είναι η μεταφορά χοληστερόλης από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς. Τα LDL σωματίδια προσλαμβάνονται από τους LDLR υποδοχείς των περιφερικών κυττάρων. Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν την apoB-100 στην επιφάνεια των LDL σωματιδίων, η οποία αποτελεί τη μοναδική απολιποπρωτεΐνη των σωματιδίων αυτών. Με τον τρόπο αυτό καταβολίζονται τα LDL σωματίδια αποδίδοντας στο κύτταρο τη χοληστερόλη που μεταφέρουν. Τα LDL σωματίδια προσλαμβάνονται, επίσης, από τους LDLR υποδοχείς των ηπατοκυττάρων όπου και καταβολίζονται, και έτσι απομακρύνονται από την κυκλοφορία. Όπως προαναφέρθηκε, τα LDL σωματίδια σχηματίζονται κυρίως στο πλάσμα από τα VLDL σωματίδια, ωστόσο ένα μικρό ποσοστό τους εκκρίνεται από το ήπαρ [53].

Το μονοπάτι των HDL σωματιδίων: μέσω του μονοπατιού αυτού, η περίσσεια λιπιδίων από τους περιφερικούς ιστούς προσλαμβάνεται υπό μορφή ελεύθερης χοληστερόλης και μεταφέρεται με τη μορφή εστέρων χοληστερόλης στο ήπαρ όπου και καταβολίζεται (Εικόνα 1.4). Ένα ποσοστό της εστεροποιημένης χοληστερόλης των HDL σωματιδίων μεταφέρεται μέσω της CEPT στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apoB (apoB-λιποπρωτεΐνες: VLDL, IDL, LDL και υπολείμματα χυλομικρών) σε ανταλλαγή με τριγλυκερίδια, και διαμέσου των λιποπρωτεϊνών αυτών μεταφέρεται και καταβολίζεται στο ήπαρ. Η HDL βιοσυντίθεται εξωκυτταρικά μέσω ενός πολύπλοκου μονοπατιού στο οποίο συμμετέχουν ένζυμα, διαμεμβρανικοί μεταφορείς λιπιδίων και η apoA-I, η οποία είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη της HDL (Ενότητα 1.2.3.1, Εικόνα 1.4). Η apoA-I παράγεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα αλλά και στο βλενογόνο του λεπτού εντέρου, και είναι απαραίτητη για τη βιογένεση και αναδιαμόρφωση των HDL σωματιδίων. Αρχικά, σχηματίζονται HDL σωματίδια που είναι φτωχά σε λιπίδια (pre-β-HDL) μέσω αλληλεπίδρασης της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I με τον ηπατικό διαμεμβρανικό μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 (ATP Binding Cassette Transporter A1).

Τα pre-β-HDL σωματίδια ωριμάζουν προσλαμβάνοντας επιπρόσθετα φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη από τις μεμβράνες των περιφερικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό, τα pre-β-HDL σωματίδια επάγουν την εκροή της περίσσειας χοληστερόλης από τα περιφερικά κύτταρα και τη μεταφορά της στο ήπαρ. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (RCT, reverse cholesterol transport) (Ενότητα 1.3.2.1) [53] [55].



Εικόνα 1.3: Τα μονοπάτια μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών: 1) το μονοπάτι των χυλομικρών, 2) το μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL σωματιδίων και 3) το μονοπάτι των HDL σωματιδίων [9].

1.2.3 Το μεταβολικό μονοπάτι των HDL σωματιδίων

1.2.3.1 Βιογένεση, αναδιαμόρφωση και καταβολισμός των HDL σωματιδίων

Βιογένεση (Εικόνα 1.4): Αρχικό βήμα στη βιογένεση των HDL σωματιδίων αποτελεί η σύνθεση και έκκριση της apoA-I από το ήπαρ και το λεπτό έντερο. Η ελεύθερη λιπιδίων apoA-I αλληλεπιδρά με τον ABCA1 στην κυτταρική μεμβράνη των περιφερικών κυττάρων (όπως, ήπαρ (κυρίως), παχύ έντερο και μακροφάγα) και προσλαμβάνει κυτταρικά φωσφολιπίδια και περίσσεια ελεύθερης (μη εστεροποιημένη) χοληστερόλης. Η μεταφορά λιπιδίων από τα κύτταρα στην apoA-I οδηγεί στο σχηματισμό των φτωχών σε λιπίδια apoA-I σωματιδίων (pre-β-HDL). Τα pre-β-HDL σωματίδια προσλαμβάνουν από τις μεμβράνες των περιφερικών κυττάρων (κυρίως μακροφάγα) επιπρόσθετα φωσφολιπίδια και ελεύθερη

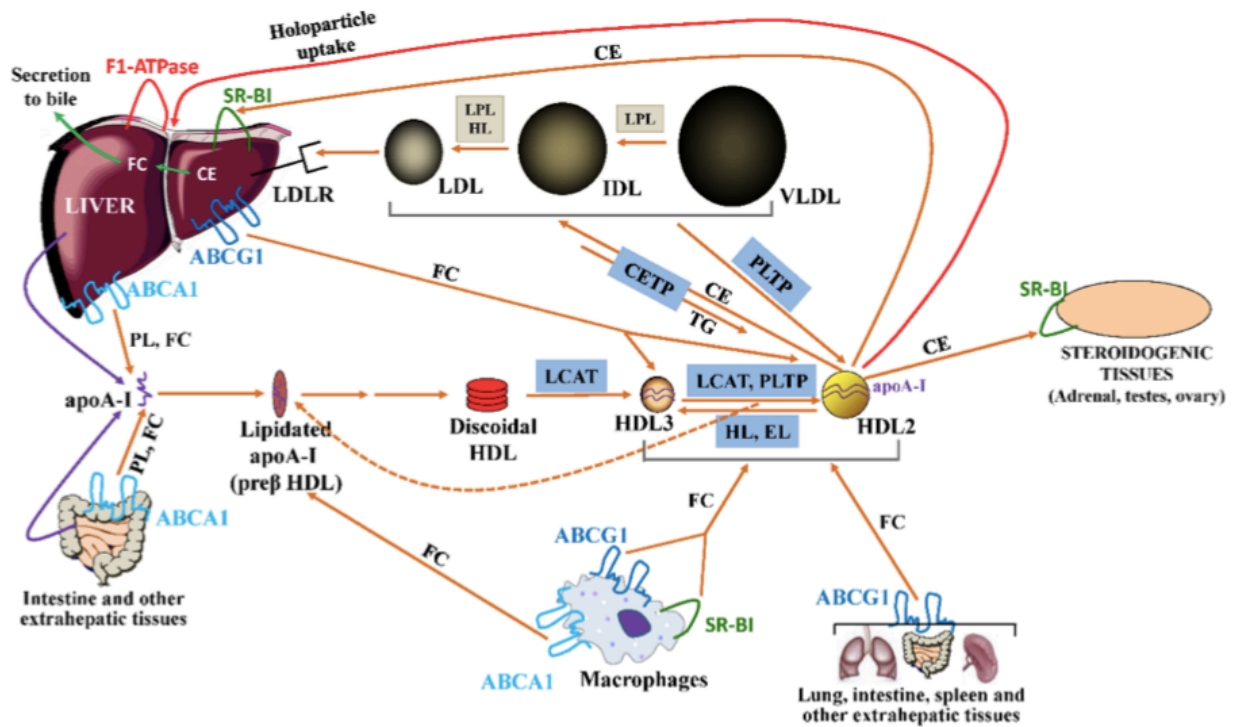
χοληστερόλη μέσω αλληλεπίδρασης με τον ABCA1 και σχηματίζουν τα δισκοειδή HDL σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά είναι πλούσια σε ελεύθερη χοληστερόλη και αντιπροσωπεύουν την ανώριμη μορφή της HDL. Τα δισκοειδή μετατρέπονται σε σφαιρικά HDL σωματίδια με τη δράση του ενζύμου λεκιθινο-χοληστερολο-ακυλοτρανσφεράση (LCAT, lecithin:cholesterol acyl transferase), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των HDL σωματιδίων [56]. Ειδικότερα, η LCAT καταλύει την εστεροποίηση των 3β-υδροξυλομάδων της ελεύθερης χοληστερόλης που βρίσκεται στην επιφάνεια των δισκοειδών HDL σωματιδίων μεταφέροντας ένα λιπαρό οξύ από την sn-2 θέση της λεκιθίνης. Η εστεροποιημένη χοληστερόλη, ως περισσότερο υδρόφοβο μόριο, συσσωρεύεται στο μη πολικό πυρήνα των HDL σωματιδίων. Ο επακόλουθος σχηματισμός του υδρόφοβου πυρήνα από εστέρες χοληστερόλης οδηγεί στη μετατροπή των δισκοειδών HDL σωματιδίων σε μικρά σφαιρικά HDL3 σωματίδια [57].

Αναδιαμόρφωση (Εικόνα 1.4): Τα νεοσυντιθέμενα ώριμα σφαιρικά HDL3 σωματίδια υφίστανται μία συνεχή διαδικασία αναδιαμόρφωσης στην κυκλοφορία. Ειδικότερα, τα σφαιρικά HDL3 σωματίδια επάγουν την εκροή ελεύθερης χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων της περιφέρειας μέσω αλληλεπίδρασης με το διαμεμβρανικό μεταφορέα λιπιδίων ABCG1 (ATP-Binding Cassette Transporter Member 1 Of Subfamily G). Ο ABCG1, ο οποίος εκφράζεται κυρίως σε σπλήνα, θύμο, πνεύμονα, εγκέφαλο, ήπαρ, ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα, επάγει τη μεταφορά της κυτταρικής χοληστερόλης στα HDL3 σωματίδια, αλλά όχι στη φτωχή σε λιπίδια ή ελεύθερη λιπιδίων apoA-I [58]. Η πρόσληψη της κυτταρικής ελεύθερης χοληστερόλης από τα HDL3 σωματίδια που μεσολαβείται από τον ABCG1 και η επακόλουθη εστεροποίησή της μέσω της LCAT οδηγεί στη μετατροπή των σωματιδίων στα μεγαλύτερου μεγέθους ώριμα σφαιρικά HDL2 σωματίδια. Ο σχηματισμός HDL2 σωματιδίων από τα HDL3 σωματίδια μεσολαβείται, επίσης, μέσω πρόσληψης φωσφολιπιδίων από τα VLDL/LDL σωματίδια και τα υπολείμματα των VLDL και χυλομικρών με τη δράση της πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP, phospholipid transfer protein). Τα HDL2 σωματίδια μπορούν, επίσης, να δημιουργηθούν από τη σύντηξη των HDL3 σωματιδίων με άλλα HDL3 σωματίδια με τη δράση της PLTP [59].

Στη δημιουργία μικρότερων σφαιρικών HDL3 ή pre-β-HDL σωματιδίων εμπλέκονται ποικίλοι μηχανισμοί. Τα σωματίδια αυτά μπορούν να συμμετέχουν σε ένα νέο κύκλο ωρίμανσης, μέσω επαναπρόσληψης κυτταρικών λιπιδίων διαμέσου του ABCA1, και αναδιαμόρφωσης. Ειδικότερα, τα ώριμα HDL2 σωματίδια αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα SR-BI (scavenger receptor class B type I) που εκφράζεται στους στεροειδογενείς ιστούς (επινεφρίδια,

ωοθήκες, όρχεις) οδηγώντας στην επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων χοληστερόλης της HDL2 από τους ιστούς αυτούς για τη σύνθεση στεροειδών ορμονών [60, 61]. Επιπλέον, οι εστέρες χοληστερόλης μπορούν να μεταφερθούν από την HDL2 στα VLDL/IDL και LDL σωματίδια και στα χυλομικρά μέσω της CEPT σε ανταλλαγή με τριγλυκερίδια [62]. Τέλος, η υδρόλυση των λιπιδίων στα HDL2 σωματίδια από τις λιπάσες HL και EL (endothelial lipase, ενδοθηλιακή λιπάση) οδηγεί στο σχηματισμό των HDL3 σωματιδίων [56]. Η HL, η οποία εκκρίνεται από το ήπαρ, υδρολύει τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια των HDL2 σωματιδίων, ενώ η παρατεταμένη δράση της στα HDL3 σωματίδια οδηγεί στην παραγωγή των pre-β-HDL σωματιδίων [63]. Η EL, η οποία συντίθεται και εκκρίνεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, καταλύει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων στα HDL2 σωματίδια [64].

Καταβολισμός (Εικόνα 1.4): Τα HDL2 σωματίδια μεταφέρουν τους εστέρες χοληστερόλης στο ήπαρ είτε μέσω του μεταβολικού μονοπατιού VLDL/IDL/LDL (Ενότητα 1.2.2) ή μέσω της επιλεκτικής πρόσληψης εστεροποιημένης χοληστερόλης από τον ηπατικό υποδοχέα SR-BI. Στη συνέχεια, η χοληστερόλη εκκρίνεται στη χολή μέσω των μεταφορέων ABCG5/G8 και έπειτα στα περιττώματα, προκειμένου να απομακρυνθεί από το σώμα [56]. Ο ηπατικός υποδοχέας SR-BI συνδέεται με τα HDL2 σωματίδια μέσω της apoA-I, προσλαμβάνει εκλεκτικά τους εστέρες χοληστερόλης από αυτά και τους μεταφέρει εντός του ηπατοκυττάρου. Με τον τρόπο αυτό, οι εστέρες χοληστερόλης απομακρύνονται από την κυκλοφορία χωρίς να προσλαμβάνονται και να αποικοδομούνται ολόκληρα τα HDL2 σωματίδια, με αποτέλεσμα την αναγέννηση των pre-β-HDL σωματιδίων [60, 61]. Εκτός από τον καταβολισμό των εστέρων χοληστερόλης, ολόκληρα τα HDL σωματίδια μπορούν να απομακρυνθούν από το πλάσμα και έπειτα να αποικοδομηθούν μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών: 1) Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την πρόσδεση της apoA-I των HDL2 σωματιδίων στην ectopic β αλυσίδα της F1-ATPάσης (ecto-F1-ATPase) στα ηπατοκύτταρα, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του ηπατικού υποδοχέα P2Y13 (Purinergic Receptor P2Y13). Η ενεργοποίηση του P2Y13 επάγει την ενδοκύτωση ολόκληρου του HDL2 σωματιδίου [65]. 2) Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την πρόσδεση των pre-β-HDL σωματιδίων σε υποδοχείς κυβιλίνης/μεγαλίνης των επιθηλιακών κυττάρων στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια του φλοιού των νεφρών, μέσω των οποίων μεσολαβείται η ενδοκύτωση των σωματιδίων αυτών [66].



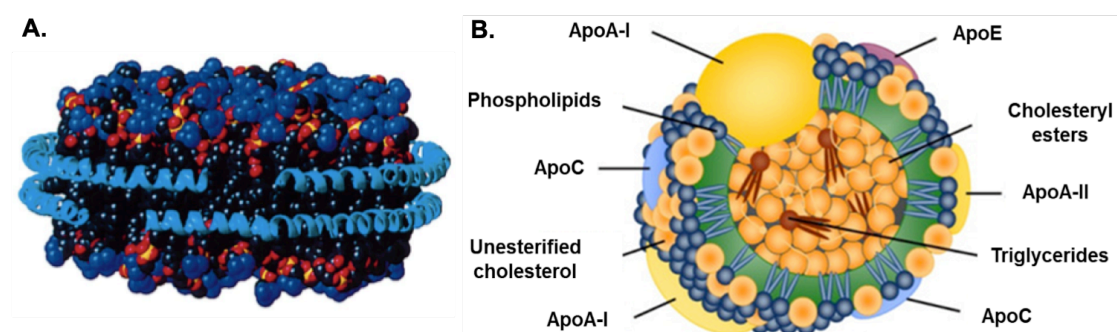
Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολικού μονοπατιού της HDL: βιογένεση, αναδιαμόρφωση και καταβολισμός των HDL σωματιδίων [67].

1.2.3.2 Δομή HDL σωματιδίων

Οι υποπληθυσμοί HDL του πλάσματος χαρακτηρίζονται από μία ετερογένεια ως προς τη δομή, τη πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση και τη λειτουργικότητα. Η apoA-I είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη όλων σχεδόν των HDL υποπληθυσμών και αντιπροσωπεύει το 70% της συνολικής πρωτεΐνης της HDL. Η apoA-I είναι απαραίτητη για τη βιογένεση, τη δομική σταθερότητα και τη λειτουργικότητα της HDL (Ενότητα 1.2.3.1). Άλλες απολιποπρωτεΐνες, όπως οι apoA-II (20%), apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE, apoD, apoM, apoJ και apoL-I, αποτελούν, επίσης, συστατικά ορισμένων υποπληθυσμών της HDL αλλά απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό (Πίνακας 1.2, Εικόνες 1.2, 1.5) [68].

Η λιπιδική σύσταση των HDL υποπληθυσμών του πλάσματος καθορίζει το σχήμα τους, το οποίο είναι δισκοειδές ή σφαιρικό (Εικόνα 1.5). Τα δισκοειδή HDL σωματίδια είναι μικρού μεγέθους και φτωχά σε λιπίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν τις ανώριμες HDL μορφές. Τα σωματίδια αυτά αποτελούνται από φωσfolιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και apoA-I σε διαμόρφωση δισκοειδούς διπλοστοιβάδας. Αντίθετα, τα σφαιρικά HDL σωματίδια είναι μεγαλύτερου μεγέθους πλούσια σε λιπίδια και αντιπροσωπεύουν τις ώριμες HDL μορφές. Τα σωματίδια αυτά αποτελούνται από ένα μη πολικό (υδρόφοβο) πυρήνα από εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια, ο οποίος περιβάλεται από ένα εξωτερικό πολικό (υδρόφιλο) φλοιό από φωσfolιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και apoA-I [68, 69].

Στο προτεινόμενο μοντέλο «διπλής ζώνης» (the «double belt» model) των δισκοειδών HDL σωματιδίων, δύο μόρια apoA-I προσδένονται με έναν αντιπαράλληλο προσανατολισμό περιμετρικά σε μία δισκοειδή διπλοστοιβάδα 160 μορίων λιπιδίων, μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 1.5A). Όταν η χοληστερόλη εστεροποιείται, τα δισκοειδή σωματίδια μετατρέπονται σε σφαιρικά τα οποία αποτελούνται από μία μονοστοιβάδα αμφιπαθών α-ελίκων apoA-I, φωσφολιπιδίων (26-32%) (κυρίως φωσφατιδυλοχολίνη) και μία σχετικά μικρή ποσότητα ελεύθερης χοληστερόλης (3-5%) και ένα πυρήνα από εστέρες χοληστερόλης (15-20%) και μία μικρή ποσότητα τριγλυκεριδίων (~ 2-7%) (Εικόνα 1.5B) [70, 71]. Σε υγιείς ανθρώπους, η πλειοψηφία των HDL σωματιδίων στην κυκλοφορία είναι ώριμα σφαιρικά [68].



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου «διπλής ζώνης» των δισκοειδών HDL σωματιδίων (A) και της δομής των σφαιρικών HDL σωματιδίων (B) (A: [71], B: [72]).

Πίνακας 1.2: Πρωτεΐνες, λιπίδια και miRNAs που περιέχονται στην HDL (τροποποιημένος από: [68] και [73]).

| > 80 proteins | >200 lipid species | miRNAs |
|--|---|---|
| <u>Apolipoproteins:</u> ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoC-IV, ApoD, ApoE, ApoF, ApoH, ApoJ, ApoL-I, ApoM | <u>Phospholipids:</u> Phosphatidylcholine, PC-plasmalogen, LysoPC, Phosphatidylethanolamine, PE-plasmalogen, Phosphatidylinositol, Cardiolipin, Phosphatidylserine, Phosphatidylglycerol, Phosphatidic acid | miR-223 miR-33 miR-24 miR-30c Mir-146a miR-155 |
| <u>Enzymes:</u> LCAT, PON1, PAF-AH, GSPx-3 | <u>Sphingolipids:</u> Sphingomyelin, Ceramide, Hexosyl Cer, Lactosyl Cer, S1P, SPC | |
| <u>lipid transfer proteins:</u> PLTP, CETP | <u>Neutral lipids:</u> Cholesteryl esters, Free cholesterol, Triacylglycerides, Diacylglycerides | |
| <u>acute-phase response proteins:</u> SAA1, SAA4, Fibrinogen alpha chain | <u>Minor lipids:</u> Free fatty acids, Isoprostane-containing PC | |
| <u>Complement components:</u> C3 | | |
| <u>proteinase inhibitors:</u> Alpha-1-antitrypsin, Hrp | | |
| <u>other protein components:</u> Transthyretin, Serotransferrin, Vitamin, D-binding protein, Alpha-1Bglycoprotein, Hemopexin | | |

1.2.3.3 Ετερογένεια HDL σωματιδίων

Η HDL του πλάσματος αποτελεί μία ετερογενή ομάδα υποπληθυσμών που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση, τη δομή και τη λειτουργικότητα. Οι υποπληθυσμοί HDL εμφανίζουν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητά τους σε απολιποπρωτεΐνες και λιπίδια, καθώς και σε διάφορα ένζυμα και πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, με αποτέλεσμα να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σχήμα, την πυκνότητα, το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο και την αντιγονικότητα [74].

Τα HDL σωματίδια περιέχουν μία ποικιλία απολιποπρωτεϊνών και άλλων πρωτεϊνών. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη όλων σχεδόν των HDL υποπληθυσμών του πλάσματος είναι η apoA-I. Άλλες απολιποπρωτεΐνες, όπως οι apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE, apoD, apoM, apoJ και apoL-I, περιέχονται σε μικρότερο ποσοστό στη HDL και δεν απαντώνται σε όλους τους υποπληθυσμούς της (Πίνακας 1.2, Εικόνες 1.2, 1.5) [68]. Πρωτεωμικές αναλύσεις της HDL ταυτοποίησαν > 85 διαφορετικές πρωτεΐνες που προσδένονται σε αυτήν. Εκτός από τις απολιποπρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν: 1) πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων στο πλάσμα (όπως, PLPT και CEPT), 2)

λιπολυτικά/υδρολυτικά ένζυμα (όπως, LCAT, PON1 (HDL-associated ester hydrolase paraoxonase 1) και PAF-AH (platelet-activating factor acetylhydrolase), 3) πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονής (όπως, μέλη του συστήματος συμπληρώματος και πρωτεΐνες ανοσολογικής απόκρισης οξείας φάσης) και 4) αναστολείς πρωτεασών που εμπλέκονται στην αιμόσταση, κ.α. (Πίνακας 1.2) [69] [75-77].

Η HDL περιέχει, επίσης, ένα εύρος διαφορετικών λιπιδίων. Τα λιπίδια της HDL είναι ετερογενή και περιλαμβάνουν όχι μόνο ουδέτερα αλλά και βιοενεργά λιπίδια, όπως τα σφιγγοφωσfolιπίδια. Τα φωσfolιπίδια αντιπροσωπεύουν το 40-60% του συνολικού λιπιδιώματος της HDL και το 27-32% της συνολικής μάζας της. Αναλύσεις λιπιδιωμικής ταυτοποίησης > 200 διακριτά είδη λιπιδίων στους πέντε κύριους υποπληθυσμούς HDL τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής: φωσfolιπίδια, σφιγγολιπίδια (σφιγγοφωσfolιπίδια), ουδέτερα λιπίδια και άλλα λιπίδια που περιέχονται σε μικρό ποσοστό (Πίνακας 1.2). Μεταξύ των σφιγγοφωσfolιπιδίων που δεσμεύονται στην HDL, 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P, sphingosine-1-phosphate) αποτελεί ένα σημαντικό βιοενεργό λιπίδιο καθώς συμμετέχει στους αθηροπροστατευτικούς μηχανισμούς της HDL (Ενότητα 1.3.2) [78-80].

Η πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση των HDL σωματιδίων επηρεάζει τη δομή (Ενότητα 1.2.3.2) αλλά και τη λειτουργικότητά τους (Ενότητα 1.4.2). Πολλά από τα πρωτεϊνικά και λιπιδικά συστατικά δε μεταφέρονται απλώς στο πλάσμα μέσω της HDL, αλλά συμμετέχουν στις αθηροπροστατευτικές και τις άλλες λειτουργίες της HDL. Διαταραχές στη σύσταση της HDL που απαντώνται σε παθολογικές φλεγμονώδεις συνθήκες, οι οποίες αυξάνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, όπως η CAD, το ACS, ο σακχαρώδης διαβήτης και οι ρευματοειδείς ασθένειες, θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις λειτουργίες της HDL μετατρέποντας την σε μη λειτουργική (Ενότητα 1.4.1) [81, 82].

Τέλος, τα HDL σωματίδια περιέχουν ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών και μικρών μορίων RNAs (small RNAs) (Πίνακας 1.2). Η HDL μεταφέρει υδρόφοβους μεταβολίτες, όπως στεροειδείς ορμόνες, καρτενοειδή, βιταμίνες, χολικά οξέα, καθώς και περισσότερο πολικούς μεταβολίτες, όπως πεντιτόλη και οξαλικό οξύ που σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη [83]. Η HDL περιέχει, επίσης, small RNAs, όπως microRNAs (miRNAs), θραύσματα RNAs που προέρχονται από tRNAs, κ.α., τα οποία μεταφέρει στα κύτταρα και στους ιστούς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το προφίλ miRNAs της HDL διαφέρει μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH, familial hypercholesterolemia), ενώ τα επίπεδα σε κάποια miRNAs έχουν συσχετισθεί με ανάπτυξη CVD, όπως CAD και AMI [73] [84].

1.2.3.4 Οι υποπληθυσμοί των HDL σωματιδίων

Διακριτοί υποπληθυσμοί HDL σωματιδίων, οι οποίοι διαφέρουν ως προς την πυκνότητα, το μέγεθος, την περιεκτικότητα σε λιπίδια και πρωτεΐνες, το σχήμα και το επιφανειακό φορτίο, δημιουργούνται κατά τη βιογένεση και συνεχή αναδιαμόρφωση της HDL. Αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για το διαχωρισμό των υποπληθυσμών των HDL σωματιδίων [85].

Με τη χρήση της υπερφυγοκέντρωσης, τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητά τους σε δύο μεγάλα υποκλάσματα: 1) τα λιγότερο πυκνά και μεγάλα HDL2 σωματίδια (1.063-1.125 g/mL) και 2) τα πυκνά και μικρά HDL3 σωματίδια (1.125-1.21 g/mL) (Εικόνα 1.6A) [86]. Πρωτεωμικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι τα HDL2 σωματίδια περιέχουν κυρίως apoE, apoC-I, apoC-II και apoC-III, ενώ τα HDL3 σωματίδια φέρουν ιδίως τις apoI, apoL-I, apoF, apoA-IV, PON1/2, PON3, PLTP και PAF-AH. Οι apoA-I και apoA-II περιέχονται και στους δύο υποπληθυσμούς HDL σωματιδίων [76].

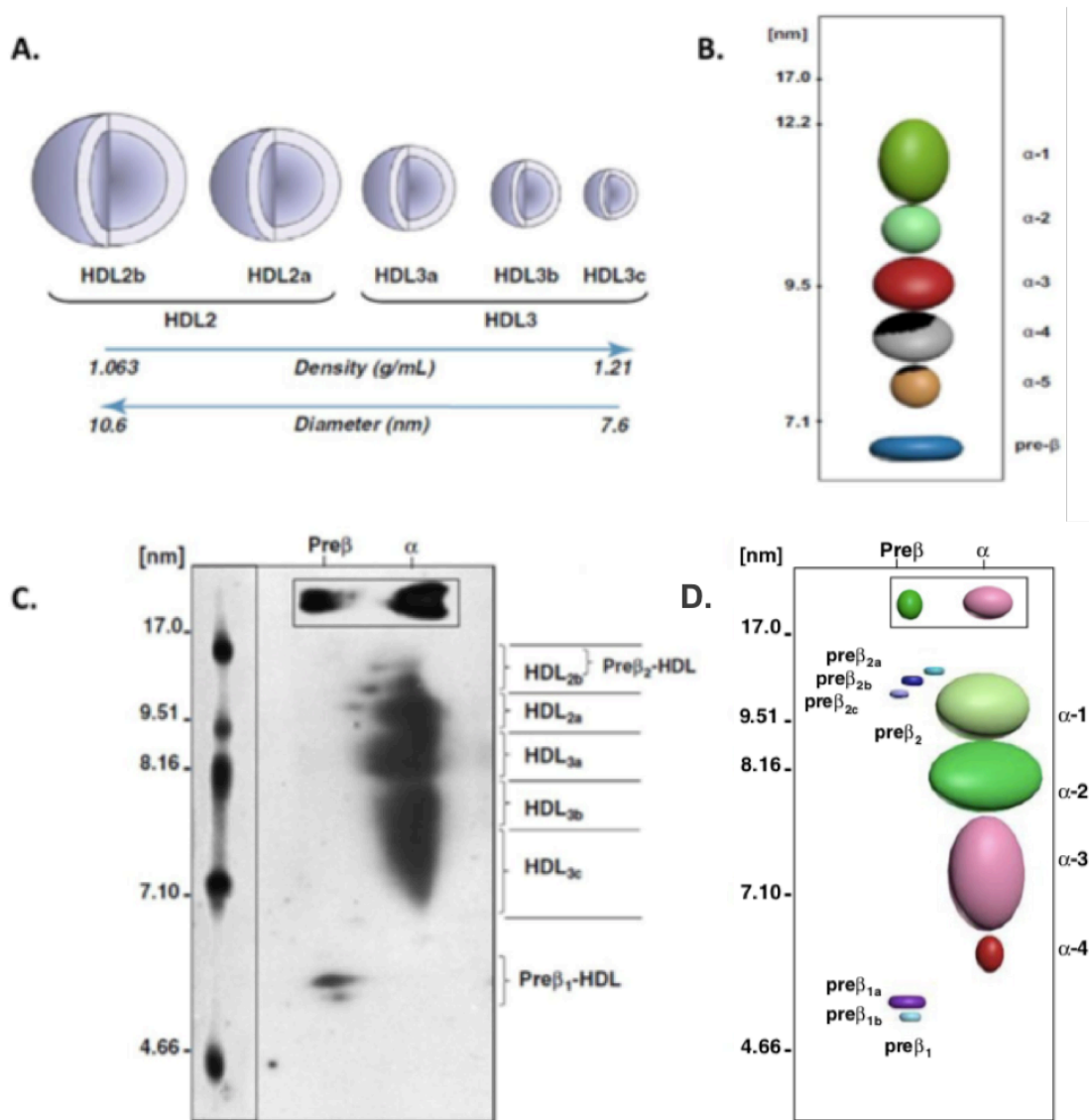
Ο διαχωρισμός των HDL σωματιδίων με βάση το μέγεθός τους μπορεί να γίνει μέσω δύο διαφορετικών τεχνικών: 1) Με την κλασική μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου διαβαθμισμένης πυκνότητας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (PAGE, polyacrylamide gradient gel electrophoresis), τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται σε πέντε διακριτούς υποπληθυσμούς με βάση τη διάμετρό τους: HDL2b (~10.6 nm), HDL2a (~9.2 nm), HDL3a (~8.4 nm), HDL3b (~8.0 nm), HDL3c (~7.6 nm) (Εικόνα 1.6A, B) [87]. 2) Με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR, nuclear magnetic resonance), τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται σε τρία διακριτά υποκλάσματα: τα μεγάλου μεγέθους HDL (9.4-14.0 nm διάμετρος), τα μέτριου μεγέθους HDL (8.2-9.4 nm) και τα μικρού μεγέθους HDL (7.3-8.2 nm) σωματίδια (Εικόνα 1.6Δ) [88].

Εφαρμόζοντας μεθόδους ανοσοσυγγένειας, τα HDL σωματίδια μπορούν να διαχωριστούν με βάση τη σύσταση σε απολιποπρωτεΐνες σε δύο μεγάλους διακριτούς υποπληθυσμούς: 1) τα HDL σωματίδια που περιέχουν apoA-I (LpA-I, lipoprotein A-I) και 2) τα HDL σωματίδια που περιέχουν apoA-I και apoA-II (LpA-I:A-II) [89].

Με βάση το επιφανειακό φορτίο, τα HDL σωματίδια μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση αгарόζης του πλάσματος σε τρεις υποπληθυσμούς: 1) Τα α-HDL σωματίδια (ή α-LpA-I) είναι το κλάσμα της HDL που μεταναστεύει στην περιοχή των α-σφαιρινών (δηλαδή παρουσιάζει α-ηλεκτροφορητική κινητικότητα). Το κλάσμα αυτό περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό της apoA-I του πλάσματος και περιλαμβάνει τα ώριμα σφαιρικά HDL σωματίδια (διάμετρου 7-14 nm) που αποτελούν την πλειοψηφία των HDL σωματιδίων του πλάσματος. 2) Τα pre-β-HDL σωματίδια (ή pre-β-LpA-I) είναι είτε δισκοειδή ή φτωχά σε λιπίδια HDL σωματίδια που αποτελούνται από apoA-I και λιπίδια, τα οποία εμφανίζουν β-

ηλεκτροφορητική κινητικότητα και αντιπροσωπεύουν τις ανώριμες μορφές της HDL του πλάσματος. Ένα μικρό ποσοστό 5-15% της apoA-I του πλάσματος είναι προσδεσμένη στα pre-β-HDL σωματίδια. 3) Τα γ-HDL σωματίδια (ή γ-LpE) είναι σφαιρικά HDL σωματίδια, τα οποία περιέχουν ως μοναδική απολιποπρωτεΐνη την apoE και είναι φτωχά σε λιπίδια, με την σφιγγομυελίνη να αποτελεί το κυριότερο λιπιδικό συστατικό τους. Τα σωματίδια αυτά παρουσιάζουν γ-ηλεκτροφορητική κινητικότητα [90, 91].

Τα HDL σωματίδια μπορούν διαχωριστούν με βάση το μέγεθος και ταυτόχρονα το επιφανειακό τους φορτίο μέσω δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (2D-PAGGE) σε δώδεκα διακριτούς υποπληθυσμούς: preβ1a, preβ1b, preβ2a, preβ2b, preβ2c, α1, α2, α3, α4, preα-1, preα-2 και preα-3 (Εικόνα 1.6Γ, Δ) [92].



Εικόνα 1.6: Η ετερογένεια της HDL. Α) Κύριοι υποπληθυσμοί των HDL σωματιδίων που κατηγοριοποιούνται με βάση την πυκνότητα και το μέγεθος μετά από υπερφυγοκέντρωση. Β) Σχηματική αναπαράσταση κατανομής των HDL-α υποπληθυσμών που περιέχουν apoA-I (HDL-apoA-I) με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα μετά από PAGGE ηλεκτροφόρηση (5-35%) σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Γ) Υποπληθυσμοί HDL-apoA-I σωματιδίων που διαχωρίστηκαν με βάση το επιφανειακό φορτίο και το μέγεθος με δύο διαστάσεων PAGGE (3-24%) ηλεκτροφόρηση (2D-PAGGE) σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Δ) Σχηματική αναπαράσταση κατανομής των HDL-apoA-I υποπληθυσμών μετά από 2D-PAGGE με βάση το επιφανειακό φορτίο και το μέγεθος (Α: [93], Β, C, D: [85]).

1.2.3.5 Ο ρόλος της apoA-I στη βιογένεση της HDL

1.2.3.5.1 Δομή και παραγωγή της apoA-I

Η apoA-I είναι η κύρια πρωτεΐνη της HDL με σημαντικό ρόλο τόσο στη βιογένεση όσο και στη λειτουργικότητά της. Η apoA-I βρίσκεται, επίσης, στα χυλομικρά και σε ελάχιστες ποσότητες στα υπολείμματα χυλομικρών και στην VLDL [53]. Το 5-15% της apoA-I στο πλάσμα του ανθρώπου δεν περιέχεται σε λιποπρωτεΐνες αλλά συναντάται με τη μορφή pre-β HDL σωματιδίων (σύμπλοκα της apoA-I με φωσφολιπίδια και χοληστερόλη) ή ελεύθερης από λιπίδια apoA-I [71]. Η apoA-I παράγεται κυρίως στο ήπαρ αλλά και στο λεπτό έντερο και εκκρίνεται στην κυκλοφορία σε πρόδρομη μορφή (pro-apoA-I), η οποία μέσω πρωτεόλυτικής επεξεργασίας μετατρέπεται στην ώριμη μορφή. Η παραγόμενη στο ήπαρ apoA-I εισέρχεται στην κυκλοφορία μέσω των πρόδρομων HDL σωματιδίων (pre-β HDL), ενώ η apoA-I που παράγεται στο λεπτό έντερο εισέρχεται μέσω των χυλομικρών από όπου μεταφέρεται στα HDL σωματίδια μετά την υδρόλυσή τους (Ενότητα 1.2.2) [94, 95].

Το γονίδιο της apoA-I βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11, όπου τοποθετείται στο 5' άκρο ενός συμπλέγματος γονιδίων μαζί με τα γονίδια της apoC-III και της apoA-IV [96]. Η ώριμη apoA-I αποτελείται από 243 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 28 kDa. Η N αμινο-τελική περιοχή της apoA-I εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 1-43 και η C καρβοξυτελική περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 44-243. Η C καρβοξυτελική περιοχή περιέχει τις περιοχές πρόσδεσης της apoA-I με τα λιπίδια/δέσμευσης λιπιδίων [71]. Η δευτεροταγή δομή της apoA-I χαρακτηρίζεται από οχτώ αμφιπαθείς α-έλικες 22 αμινοξέων και δύο επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 11 αμινοξέων. Οι αμφιπαθείς αυτές έλικες είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση της apoA-I με τα λιπίδια [97, 98]. Οι αμινοξικές αλληλουχίες 218-222 και 225-230 της apoA-I συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις της apoA-I με τον ABCA1 και την LCAT. Οι αλληλουχίες αυτές είναι σημαντικές για την εκροή χοληστερόλης, την

ενεργοποίηση της LCAT, τη μετατροπή των preβ-HDL και α4-HDL δισκοειδών σωματιδίων σε ώριμα σφαιρικά α-HDL σωματίδια και, συνεπώς, για τη βιογένεση της HDL [99, 100].

1.2.3.5.2 Βιογένεση HDL-αροΑ-I σωματιδίων

Η αροΑ-I παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση των HDL σωματιδίων (Εικόνα 1.4, Ενότητα 1.2.3.1). Η αροΑ-I αλληλεπιδρά με τον ABCA1 προάγοντας την εκροή περίσσειας χοληστερολης από τους περιφερικούς ιστούς και τη βιογένεση της HDL, και δρα ως ικρίωμα για την πρόσληψη των λιπιδίων [56]. Η υπερέκφραση μεταλλαγμένων μορφών της αροΑ-I στο C-τελικό άκρο (αμινοξικές αλληλουχίες 220-231), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση της αροΑ-I με τον ABCA1, σε αροΑ-I -/- ή αροΑ-I -/- x αροΕ -/- ποντίκια οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της HDL πλάσματος λόγω μειωμένης εκροής χοληστερόλης [99-101]. Ο σχηματισμός ώριμων λειτουργικών σφαιρικών HDL σωματιδίων απαιτεί τη δράση της LCAT, η οποία ενεργοποιείται από την αροΑ-I [56]. Η υπερέκφραση φυσικών μεταλλάξεων της ανθρώπινης αροΑ-I, αροΑ-I(Leu141Arg)PISA (L141RPisa) και αροΑ-I(Leu159Arg)FIN (L159RFIN), σε διαγονιδιακά αροΑ-I -/- ποντίκια οδήγησε σε μείωση της HDL-C στο πλάσμα, η οποία αποτελούνταν από μικρού μεγέθους HDL σωματίδια (preβ2 και α3, α4) εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας της αροΑ-I να ενεργοποιεί την LCAT [102]. Η αροΑ-I μέσω αλληλεπίδρασης με τους ABCG1 και SR-BI, συμμετέχει, επίσης, στην αναδιαμόρφωση και τον καταβολισμό της HDL (Εικόνα 1.4, Ενότητα 1.2.3.1) [56]. Η αροΑ-I, σε μορφή ελεύθερη λιπιδίων ή HDL, αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς SR-BI και ecto-F1-ATPase ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στις ποικίλες αθηροπροστατευτικές της δράσης (Ενότητα 1.3.2) [103].

1.2.3.6 Ο ρόλος της αροΕ στη βιογένεση της HDL

1.2.3.6.1 Δομή και παραγωγή της αροΕ

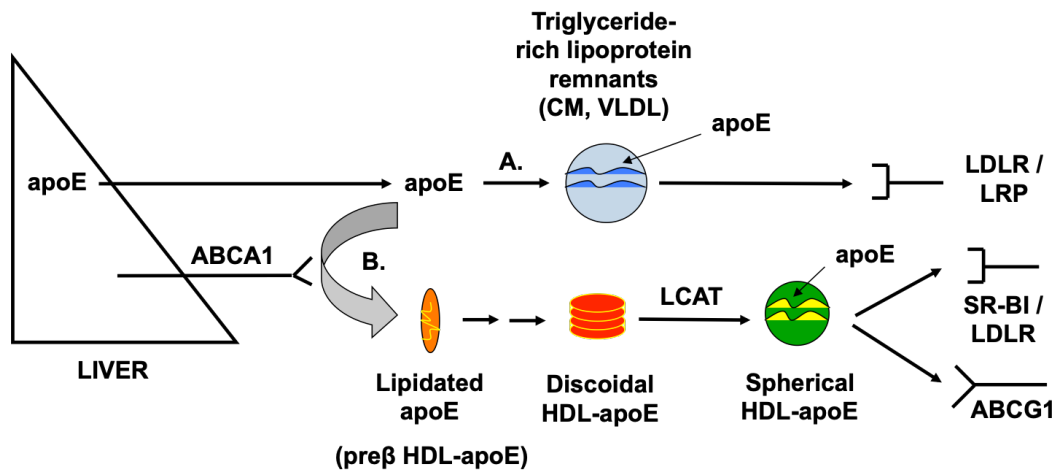
Η αροΕ παίζει σημαντικό δομικό και λειτουργικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (Εικόνες 1.2, 1.7). Η αροΕ είναι η κύρια πρωτεΐνη των χυλομικρών και VLDL και των υπολειμμάτων τους, ενώ απαντάται και στις HDL και IDL (Εικόνα 1.2) [54] [104]. Περίπου 20% της αροΕ του πλάσματος δεν είναι συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες και συναντάται ως φτωχή σε λιπίδια ή ελάχιστα λιπιδιωμένη αροΕ (preβ1 HDL) [105]. Η αροΕ συντίθεται στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς, όπως εγκέφαλο, σπλήνα, πνεύμονα, νεφρό, επινεφρίδια, ωοθήκη, καρδιά και σκελετικούς μύες. Η περισσότερη αροΕ του πλάσματος συντίθεται στο ήπαρ (> 75%) και ~ το 20-40% προέρχεται από εξωηπατικές πηγές, όπως τα μακροφάγα [106, 107].

Η αροΕ είναι συνδέτης των ηπατικών υποδοχέων LDLR και LRP, ενώ προσδένεται και στις

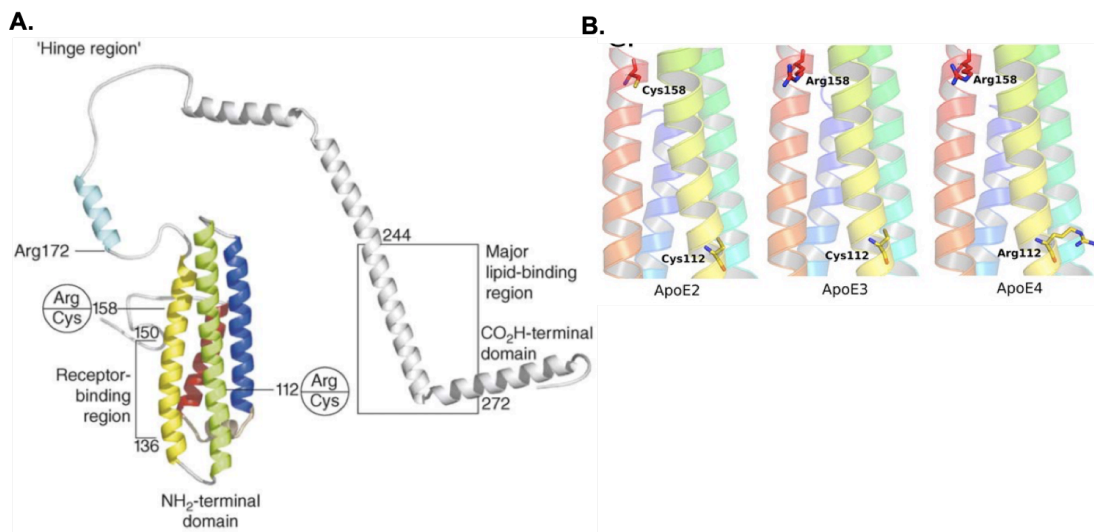
πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης (HSPGs, heparan sulfate proteoglycans) του ήπατος. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, η apoE επάγει τον ηπατικό καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια apoB-λιποπρωτεϊνών (χυλομικρά και VLDL) και των υπολειμμάτων τους, συμβάλλοντας στην ομοίωση της χοληστερόλης του πλάσματος (Εικόνα 1.7A) [108]. Η φτωχή σε λιπίδια apoE προσδένεται στον ABCA1 και με τον τρόπο αυτό επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και τη βιογένεση HDL σωματιδίων περιέχουν apoE (HDL-apoE) (Εικόνα 1.7B) [109-111]. Η λιπιδιωμένη μορφή της apoE (HDL-apoE) αλληλεπιδρά με τον ABCG1 και επάγει, επίσης, εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα [112]. Η λιπιδιωμένη μορφή της apoE (HDL-apoE) συνδέεται, επίσης, με τον υποδοχέα SR-BI και η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να οδηγήσει είτε σε εκροή χοληστερόλης από τα περιφερικά κύτταρα (π.χ. μακροφάγα) ή στη μεταφορά χοληστερόλης στο ήπαρ (Εικόνα 1.7B) [113, 114].

Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί την apoE έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19q13.1, όπου τοποθετείται στο 5' άκρο ενός συμπλέγματος γονιδίων μεγέθους 50 kb μαζί με το γονίδιο της apoC-I, ένα apoC-I ψευδογονίδιο και τα γονίδια της apoC-II και apoC-IV [115]. Το γονίδιο της apoE περιέχει τέσσερα εξώνια που διαχωρίζονται από τρία εσώνια και κωδικοποιεί μία πρόδρομης μορφής πρωτεΐνη 317 αμινοξέων. Η πρόδρομη apoE μέσω διάσπασης του πεπτιδίου σήματος των 18 αμινοξέων του αμινο-τελικού άκρου μετατρέπεται στην ώριμη μορφή [96]. Η ώριμη apoE αποτελείται από 299 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 34 kDa. Η N αμινο-τελική περιοχή της apoE εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 1-191 και φέρει τη δομή ενός επιμήκους δεματίου τεσσάρων αμφιπαθών α-ελίκων (αμινοξέα 24-42, 54-81, 87-122, 130-164, αντίστοιχα) με αντιπαράλληλη φορά που σταθεροποιείται με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και γέφυρες αλάτων. Η αμινο-τελική περιοχή περιέχει την περιοχή πρόσδεσης της apoE στον LDLR και LRP υποδοχέα, η οποία εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 136-150 της έλικας 4 και χαρακτηρίζεται από την παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέων αργινίνης και λυσίνης (Εικόνα 1.8A) [116, 117]. Στην έλικα 4 εντοπίζεται, επίσης, η περιοχή πρόσδεσης της apoE στις HSPGs του ήπατος [118]. Η αμινο-τελική περιοχή περιλαμβάνει και την περιοχή πρόσδεσης της apoE στον SR-BI [119]. Η C καρβοξυ-τελική περιοχή περιέχει αμφιπαθείς α-έλικες που συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τα λιπίδια [120]. Ειδικότερα, η C καρβοξυ-τελική περιοχή εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων ~225-299 και περιέχει την περιοχή πρόσδεσης της apoE με τα λιπίδια (περιοχή δέσμευσης λιπιδίων), η οποία εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων ~240-260 (Εικόνα 1.8A) [117]. Η καρβοξυ-τελική περιοχή που εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 222-299 είναι απαραίτητη για την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα που

μεσολαμβάνεται από την αλληλεπίδραση της apoE με τον ABCA1 [109].



Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση της συμμετοχής της apoE στην ηπατική κάθαρση των υπολειμμάτων των αθηρογόνων πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών (χυλομικρά και VLDL) (A) και στο μονοπάτι βιογένεσης HDL-apoE σωματιδίων (B) (τροποποιημένη από: [111]).



Εικόνα 1.8: Μοντέλο δομής της ελεύθερης λιπιδίων apoE και οι ισομορφές της. A) Η περιοχή πρόσδεσης στους ηπατικούς υποδοχείς LDLR και LRP εντοπίζεται στην αμινο-τελική περιοχή, ενώ η περιοχή δέσμευσης λιπιδίων εκτείνεται στην καρβοξυ-τελική περιοχή της apoE. Η αμινο-τελική και η καρβοξυτελική περιοχή συνδέονται με μία περιοχή άρθρωσης. B) Θέσεις της αμινοξικής αντικατάστασης στην N αμινο-τελική περιοχή μεταξύ των ισομορφών apoE2, apoE3 και apoE4 (A: [121], B: [122]).

1.2.3.6.2 Βιογένεση HDL-αροΕ σωματιδίων

Η βιογένεση της HDL δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την αροΑ-I. Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η αροΕ όσο και η αροC-III και η αροΑ-IV προάγουν τη *de novo* βιοσύνθεση HDL σωματιδίων *in vivo* που περιέχουν αροΕ, αροC-III και αροΑ-IV, αντίστοιχα, με τη συμμετοχή των ABCA1 και LCAT. Τα σωματίδια αυτά δεν περιέχουν αροΑ-I [111] [123, 124]. Ειδικότερα, η αροΕ συμμετέχει σε ένα μονοπάτι βιογένεσης και αναδιαμόρφωσης της HDL παρόμοιο με αυτό της αροΑ-I, και σχηματίζει λειτουργικά σφαιρικά HDL σωματίδια που περιέχουν αροΕ (HDL-αροΕ) (Εικόνα 1.7B). Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του ανθρώπινου γονιδίου αροΕ4 (που κωδικοποιεί την ισομορφή αροΕ4) μέσω αδενομεταφοράς σε αροΑ-I *-/-* ποντίκια οδήγησε στο σχηματισμό δισκοειδών HDL σωματιδίων. Αντίθετα, τα σωματίδια αυτά δε σχηματίστηκαν σε ABCA1 *-/-* ποντίκια μετά από μόλυνση με αδενοϊούς που εξέφραζαν το ανθρώπινο αροΕ4 γονίδιο. Η ταυτόχρονη μόλυνση αροΑ-I *-/-* ποντικών με αδενοϊούς που εξέφραζαν το ανθρώπινο γονίδιο της αροΕ4 ή της LCAT οδήγησε στη μετατροπή των δισκοειδών HDL σωματιδίων σε σφαιρικά. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αροΕ συμμετέχει σε ένα μονοπάτι βιογένεσης ώριμων σφαιρικών HDL-αροΕ σωματιδίων *in vivo*, το οποίο απαιτεί τη λειτουργία του ABCA1 και της LCAT [111].

Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η υπερέκφραση μέσω αδενομεταφοράς της ανθρώπινης αροΕ3 ή της αροΑ-I σε αροΕ3 *-/-* x αροΑ-I *-/-* ποντίκια οδήγησε στο σχηματισμό HDL-αροΕ3 ή HDL-αροΑ-I σωματιδίων, αντίστοιχα, μέσω μεταφοράς χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων διαμέσου του ABCA1 στις εκάστοτε απολιποπρωτεΐνες. Τα σωματίδια αυτά παρουσίασαν διαφορές ως προς το μέγεθος και την απολιποπρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση. Οι HDL-αροΕ3 υποπληθυσμοί ήταν κυρίως preβ1, preβ2 και α1 σωματίδια, ενώ α3, α4, pre-α1, pre-α2 και pre-α3 σωματίδια αποτελούσαν τους HDL-αροΑ-I υποπληθυσμούς. Η διαφορά αυτή ως προς το μέγεθος των HDL-αροΕ3 και HDL-αροΑ-I υποπληθυσμών ίσως εξηγείται από το ότι η αροΕ3 οδήγησε στην πρόσληψη λιγότερων λιπιδίων στα HDL σωματίδια συγκριτικά με την αροΑ-I. Ειδικότερα, τα HDL-αροΑ-I σωματίδια περιείχαν αυξημένα επίπεδα ολικής λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC), σφυγγομυελίνης (SM), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), φωσφατιδυλοσερίνης (PS), φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) και κεραμιδίου d18:0 και d18:1. Αντίθετα, τα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και κεραμιδίου d18:2 ήταν αυξημένα στα HDL-αροΕ3 σωματίδια, ενώ τα επίπεδα φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI) και φωσφατιδικού οξέως (PA) ήταν παρόμοια μεταξύ των HDL-αροΕ3 και HDL-αροΑ-I σωματιδίων [125]. Η έκφραση της αροΕ3 οδήγησε, επίσης, στην πρόσληψη διαφορετικών απολιποπρωτεϊνών στην HDL. Ειδικότερα, η έκφραση της αροΕ3 οδήγησε στην πρόσληψη αποκλειστικά αροC-I στην HDL επάγοντας το

σχηματισμό HDL πλούσιων σε apoE3 και apoC-I. Αντίθετα, η έκφραση της apoA-I οδήγησε στην πρόσληψη αποκλειστικά apoA-II και apoC-III στην HDL, με αποτέλεσμα το σχηματισμό HDL σωματιδίων που περιείχαν apoA-I, apoA-II και apoC-III [125].

Η διαφορετική λιπιδική και απολιποπρωτεϊνική σύσταση μεταξύ των HDL-apoE3 και HDL-apoA-I σωματιδίων οδήγησε σε διαφορές σε επίπεδο λειτουργίας. Τα HDL-apoE3 σωματίδια εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω του ABCG1 *in vitro* και *in vivo*, καθώς και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro* συγκριτικά με τα HDL-apoA-I σωματίδια. Ωστόσο, τα HDL-apoE3 σωματίδια, σε αντίθεση με τα HDL-apoA-I σωματίδια, μείωσαν την επαγόμενη από το LPS (lipopolysaccharide) παραγωγή του TNF- α στα μακροφάγα *in vitro*. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των HDL-apoE3 σωματιδίων δεν εξαρτώνται από την έκφραση και την παρουσία της apoA-I. Αντίθετα, οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των HDL-apoA-I σωματιδίων εξαρτώνται από την έκφραση της apoE3 και η παρουσία της apoE3 είναι απαραίτητη προκειμένου τα σωματίδια αυτά να μειώσουν τη φλεγμονή [125].

Σε αντιστοιχία με τις δύο προαναφερόμενες μελέτες, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι υπάρχουν σφαιρικά σωματίδια HDL διαμέτρου 12-16 nm στο πλάσμα υγιούς ανθρώπου και ποντικού, τα οποία περιέχουν ως μοναδική απολιποπρωτεΐνη την apoE (σε ποσοστό 75%) και είναι φτωχά σε λιπίδια (σωματίδια γ -LpE). Η σφιγγομυελίνη (13%) αποτελεί το κυριότερο λιπιδικό συστατικό των γ -LpE σωματιδίων, ενώ περιέχουν, επίσης, φωσφατιδυλοχολίνη (7%) και μη εστεροποιημένη χοληστερόλη (5%). Τα γ -LpE σωματίδια παράγονται και εκκρίνονται από κύτταρα της περιφέρειας, όπως ηπατικά κύτταρα και περιτοναϊκά μακροφάγα. Τα σωματίδια αυτά επάγουν την εκροή χοληστερόλης από περιφερικά κύτταρα δρώντας ως αποδέκτης της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης. Με τον τρόπο αυτό, τα γ -LpE σωματίδια του πλάσματος προσλαμβάνουν την κυτταρική χοληστερόλη και τη μεταφέρουν στην α -HDL [91]. Επομένως, τα γ -LpE σωματίδια λειτουργικά μοιάζουν με τα δισκοειδή pre β 1-HDL (pre β 1-LpA-I) σωματίδια, τα οποία περιέχουν ως μοναδική απολιποπρωτεΐνη την apoA-I, είναι φτωχά σε λιπίδια και προσλαμβάνουν την ελεύθερη χοληστερόλη από τα κύτταρα της περιφέρειας. Δεδομένου ότι η apoE εκκρίνεται από μία ευρεία ποικιλία περιφερικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων και τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος, η παρουσία των γ -LpE σωματιδίων στο πλάσμα του ανθρώπου ενδεχομένως να υποδηλώνει ένα γενικό μηχανισμό μέσω του οποίου απομακρύνεται η περίσσεια χοληστερόλης από τα κύτταρα [91].

Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η έκφραση της ανθρώπινης apoE3 από τα μακροφάγα σε διαγονιδιακά apoE -/- ποντίκια, έστω και σε χαμηλά επίπεδα, οδήγησε στο σχηματισμό

HDL-apoE3 σωματιδίων (γ-LpE3, δισκοειδών preβ1-LpE3 και ώριμων σφαιρικών α-LpE3 σωματιδίων) στο πλάσμα. Τα σωματίδια αυτά απομάκρυναν την περίσσεια χοληστερόλη από τα μακροφάγα *in vitro* και αύξησαν την ικανότητα του πλάσματος των apoE -/- ποντικών να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα αυτά [126]. Τα ευρήματα των δύο μελετών υποδεικνύουν ότι τα HDL-apoE σωματίδια, πιθανώς, θα μπορούσαν να προστατεύσουν από αθηροσκλήρωση μέσω επαγωγής της εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος [91] [126]. Ο μηχανισμός αυτός ενδεχομένως να εξηγεί ότι η έκφραση της ανθρώπινης apoE3 από τα μακροφάγα, έστω και σε χαμηλά επίπεδα, σε apoE -/- ποντίκια οδηγεί σε μείωση της αθηροσκλήρωσης [127].

Τέλος, η apoE είναι μόνη απολιποπρωτεΐνη που εκφράζεται στον εγκέφαλο και μέσω σχηματισμού των HDL-apoE σωματιδίων ρυθμίζει την ομοιόσταση λιπιδίων στον ιστό αυτόν (Εικόνα 1.16). Τα σωματίδια αυτά έχουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες και παρέχουν προστασία από τη νόσο Alzheimer (AD) [128, 129].

1.3 Ο ρόλος της HDL στην αθηροσκλήρωση

1.3.1 Η HDL προστατεύει από την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης

Πολλαπλές μελέτες σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης και σε ασθενείς με CAD έχουν δείξει ότι η HDL εμποδίζει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης ή επάγει υποχώρηση της αθηρωματικής πλάκας [50] [72] [103]. Επιδημιολογικές μελέτες και κλινικές μελέτες σε ασθενείς με CAD σε συνδυασμό με μελέτες σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης έχουν δείξει ότι η αύξηση των επιπέδων HDL-C στο πλάσμα μειώνει την αθηροσκλήρωση και τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων [49] [130-132]. Ωστόσο, η αθηροπροστατευτική δράση της HDL δεν έχει συσχετισθεί μόνο με τα επίπεδα της HDL-C, αλλά και με την πρωτεϊνική και λιπιδική της σύσταση. Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL έχουν αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στην apoA-I αλλά και στα σφιγολιπίδια που περιέχει (Ενότητα 1.3.2) [50].

Ποικίλες προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι η HDL εμποδίζει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης μέσω ποικίλων μηχανισμών. Η έγχυση φυσικά απαντώμενης HDL οποία απομονώθηκε από πλάσμα υγιούς ανθρώπου (hHDL) ή ανασυγκροτημένων δισκοειδών σωματιδίων που περιείχαν την ανθρώπινη άγριου τύπου (wt) apoA-I (hapoA-I wt) ή την apoA-I Milano και φωσφολιπίδια (rHDL-apoA-I) σε apoE -/- ποντίκια ή κουνέλια με αθηροσκλήρωση εμπόδισε το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών και οδήγησε σε σημαντική υποχώρηση της αθηρωματικής πλάκας. Ο μηχανισμός δράσης των διαφορετικών αυτών μορφών HDL περιλάμβανε την επαγωγή εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα της αθηρωματικής πλάκας μέσω του ABCA1 [133, 134]. Η έγχυση rHDL-apoA-I οδήγησε, επίσης, σε

σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας μέσω μείωσης της περιεκτικότητας σε μακροφάγα και της ενεργότητας της MMP-2 [134]. Ομοίως, η έγχυση HDL που απομονώθηκε από πλάσμα κουνελιού ή rHDL-apoA-I (σύμπλοκα apoA-I από κουνέλι/φωσφατιδυλοχολίνης) σε κουνέλια με αθηροσκλήρωση μείωσε το μέγεθος της αορτικής αθηρωματικής πλάκας, την περιεκτικότητά της σε μακροφάγα και την έκφραση της MMP-9 στην πλάκα [135]. Σε συμφωνία με τα *in vivo* ευρήματα, η hHDL μείωσε την επαγόμενη από τον TNF-α ή την oxLDL αύξηση στην παραγωγή της MMP-1 σε ενεργοποιημένα πρωτογενή ανθρώπινα μονοκύτταρα [136].

Η ικανότητα της HDL να προστατεύει από αθηροσκλήρωση έχει αποδοθεί κυρίως στην ικανότητά της να επάγει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και τα άλλα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος μέσω των ABCA1, ABCG1 και SR-BI καθώς και την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης *in vivo*. Η εκροή της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών μέσω της HDL αποτρέπει τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων και απομακρύνει τη χοληστερόλη από τις αθηρωματικές πλάκες [137, 138]. Επιπλέον, η HDL μειώνει τη φλεγμονή του αρτηριακού τοιχώματος και προστατεύει την ακεραιότητα του ενδοθηλίου του έσω χιτώνα, ενώ εκδηλώνει και άλλες αθηροπροστατευτικές λειτουργίες, όπως οι αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, αγγειοδιασταλτικές και αντιαποπρωτικές ιδιότητες, η επαγωγή της παραγωγής NO στο αγγειακό ενδοθήλιο και η ικανότητα σταθεροποίησης των αθηρωματικών πλακών προς ρήξη (Εικόνα 1.9) [50] [139].

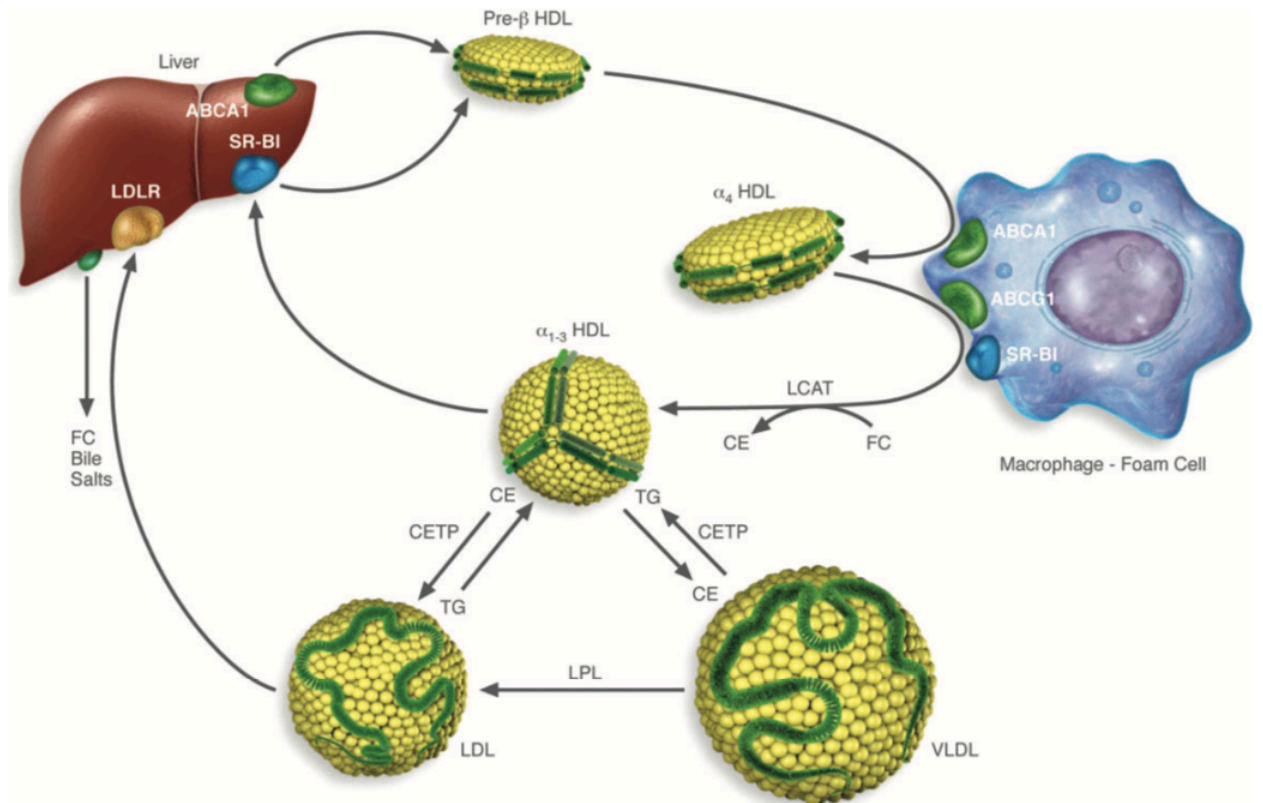
καταλληλότερος προγνωστικός δείκτης για τον κίνδυνο ASCAD συγκριτικά με τα επίπεδα HDL-C στο πλάσμα. Πολλές μελέτες σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης και ασθενείς με ASCAD έχουν δείξει ότι υπάρχει μία αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα και του κινδύνου εμφάνισης αθηροσκλήρωσης ή ASCAD [141].

Η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Εικόνα 1.10): 1) Στο πρώτο στάδιο, φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη μεταφέρονται στην apoA-I μέσω αλληλεπίδρασης με τον ABCA1 των ηπατοκυττάρων (κυρίως) και των μακροφάγων ή αφρωδών κυττάρων του αρτηρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των φτωχών σε λιπίδια preβ-HDL σωματιδίων. 2) Στο δεύτερο στάδιο, τα pre-β-HDL σωματίδια μετατρέπονται σε μεγαλύτερα δισκοειδή HDL σωματίδια (α4) μέσω πρόσληψης επιπρόσθετων λιπιδίων από τα μακροφάγα/αφρώδη κύτταρα διαμέσου του ABCA1. 3) Στο τρίτο στάδιο, τα δισκοειδή HDL σωματίδια μετατρέπονται σε σφαιρικά HDL3 σωματίδια μέσω εστεροποίησης της ελεύθερης χοληστερόλης από την LCAT. Τα σωματίδια αυτά προσλαμβάνουν ελεύθερη χοληστερόλη από τα μακροφάγα/αφρώδη κύτταρα αλληλεπιδρώντας με τον ABCG1 ή τον SRB-I, ή διαμέσου υδατικής διάχυσης, και μέσω δράσης της LCAT μετατρέπονται σε μεγαλύτερου μεγέθους σφαιρικά HDL2 σωματίδια. 4) Το τέταρτο στάδιο περιλαμβάνει τη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τα ώριμα σφαιρικά HDL2 σωματίδια στα VLDL και LDL σωματίδια σε ανταλλαγή με τριγλυκερίδια μέσω της CETP. Κατόπιν, τα υπολείμματα VLDL και κυρίως τα LDL σωματίδια προσλαμβάνονται από το ήπαρ μέσω του LDLR για απέκκριση. 5) Εναλλακτικά, η χοληστερόλη των HDL2 σωματιδίων μεταφέρεται απευθείας στο ήπαρ μέσω επιλεκτικής πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης από τον SR-BI. Στη συνέχεια, η χοληστερόλη απεκκρίνεται από το ήπαρ είτε ως ελεύθερη χοληστερόλη ή μετατρέπεται σε χολικό άλας. Το στάδιο αυτό οδηγεί στην αναγέννηση των preβ-HDL σωματιδίων [72] [142, 143].

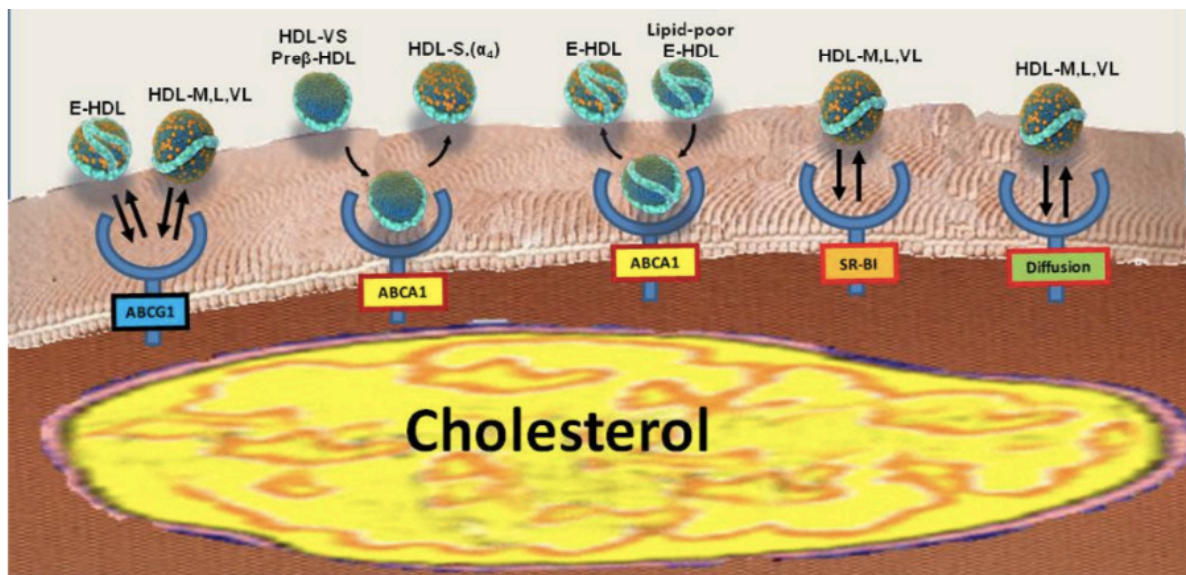
Σημαντικό βήμα στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης είναι η εκροή ελεύθερης χοληστερόλης από τα μακροφάγα στα φτωχά σε λιπίδια ή τα ώριμα HDL σωματίδια μέσω των ενεργών μονοπατιών που μεσολαβούνται από τους μεταφορείς ABCA1 ή ABCG1 (Εικόνες 1.10, 1.11). Ειδικότερα, ο ABCA1 επάγει τη μεταφορά χοληστερόλης στην ελεύθερη λιπιδίων apoA-I ή στα φτωχά σε λιπίδια HDL σωματίδια (preβ-HDL), ενώ ο ABCG1 μεταφέρει τη χοληστερόλη στα ώριμα σφαιρικά HDL σωματίδια [58] [72] [144]. Οι ABCA1 και ABCG1 μέσω επαγωγής της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης προστατεύουν από την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών από ABCA1 ^{-/-} ή ABCG1 ^{-/-} ποντίκια σε LDLR ^{-/-} ποντίκια που τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας

σε χοληστερόλη οδήγησε σε αθηροσκλήρωση. Αντίστοιχα, η μεταμόσχευση μυελού των οστών από ABCA1 $-/-$ x ABCG1 $-/-$ ποντίκια σε LDLR $-/-$ ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη πρόωμης αθηροσκλήρωσης και τη διήθηση αφρωδών κυττάρων στο μυοκάρδιο και στη σπλήνα [145].

Εκτός από τα προαναφερόμενα ενεργά μονοπάτια εκροής χοληστερόλης, η υδατική διάχυση (παθητική διάχυση σε υδατική φάση) και η διάχυση που μεσολαβείται διαμέσου του SR-BI αποτελούν δύο παθητικά μονοπάτια που μεταφέρουν τη χοληστερόλη από τα μακροφάγα στα ώριμα σφαιρικά HDL σωματίδια (Εικόνες 1.10 και 1.11). Τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται, κυρίως, όταν η συγκέντρωση χοληστερόλης στα μακροφάγα είναι υψηλή [146]. Στην υδατική διάχυση, μόρια χοληστερόλης διαχέονται από την κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων και προσλαμβάνονται από τα HDL σωματίδια [146]. Η κύρια λειτουργία του SR-BI είναι η επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από τα HDL σωματίδια στα κύτταρα, όπως ηπατοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα [60]. Ωστόσο, ο SR-BI μπορεί να επάγει εκροή ελεύθερης χοληστερόλης από τα μακροφάγα στα ώριμα HDL σωματίδια [61]. Όμως, ο ρόλος αυτός του SR-BI στην εκροή είναι διφορούμενος. Μία μελέτη έδειξε ότι οι ABCA1 και ABCG1 επάγουν την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης στα μακροφάγα *in vivo*, ενώ ο SR-BI δε συνεισφέρει στη διαδικασία αυτή [137]. Ωστόσο, η μεταμόσχευση μυελού των οστών από ABCA1 $-/-$ x SR-BI $-/-$ ποντίκια σε LDLR $-/-$ ποντίκια που τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη οδήγησε σε αύξηση του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων και της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης σε σχέση με τη μεταμόσχευση μυελού των οστών από ABCA1 $-/-$ ποντίκια. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τόσο ο ABCA1 όσο και ο SR-BI συνεισφέρουν στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης στα μακροφάγα *in vivo*, και με αυτόν τον τρόπο προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση [147].



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης [143].



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα που μεσολαβούνται από την HDL διαμέσου των ABCA1, ABCG1, SR-BI και της παθητικής υδατικής διάχυσης [142].

1.3.2.2 Η HDL επάγει την παραγωγή NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Το NO που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αγγειακής δομής, καθώς και στη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης (Ενότητα 1.1.3.1). Η μειωμένη παραγωγή του NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει δειχθεί ότι επάγει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [148]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL επάγει την πρωτεϊνική έκφραση και ενεργοποίηση της eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την επακόλουθη παραγωγή NO in vitro και in vivo. Τα συστατικά της HDL, η apoA-I, τα λυσοσφιγγολιπίδια και η PON1, παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση αυτή (Εικόνα 1.12).

Η HDL μέσω της apoA-I προσδέεται στον SR-BI ενεργοποιώντας ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 1.12) [149, 150]. Η apoA-I της HDL αλληλεπιδρά με τον SR-BI και ενεργοποιεί την κινάση τυροσίνης Src, η οποία επακόλουθα ενεργοποιεί την PI3K κινάση. Η PI3K κινάση ενεργοποιεί καθοδικά την AKT κινάση και το μονοπάτι των ERK1/2 κινασών, οι οποίες ενεργοποιούν ανεξάρτητα την eNOS. Η AKT ενεργοποιεί την eNOS μέσω φωσφορυλίωσης στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser1179. Ωστόσο, η ενεργοποίηση της eNOS μέσω των κινασών ERK1/2 περιλαμβάνει ένα μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος της φωσφορυλίωσης αυτής. Τα μονοπάτια αυτά χαρακτηρίστηκαν σε HAEC και BAEC μετά από έκθεση σε hHDL [150]. Η HDL δρώντας μέσω της apoA-I επάγει την ενεργοποίηση της eNOS καθοδικά του SR-BI μέσω επιπρόσθετων μονοπατιών. Ειδικότερα, η αλληλεπίδραση της hHDL ή της rHDL-apoA-I (σύμπλοκα hapoA-I/φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) με τον SR-BI ενεργοποίησε την ενεργοποιούμενη από το AMP πρωτεϊνική κινάση (AMPK, AMP-activated protein kinase) μέσω ενεργοποίησης των κινασών CaMKK (Calcium-Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase) και LKB1 (Liver Kinase B1 / serine-threonine kinase B1) στα HUVEC. Η AMPK ενεργοποίησε επακόλουθα το μονοπάτι PI3K/AKT και οδήγησε στη φωσφορυλίωση της eNOS [151]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL και η apoA-I ενεργοποίησαν την AMPK κινάση στα HUVEC και HAEC η οποία οδήγησε σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της eNOS σε πολλαπλές θέσεις (Ser-116, Ser-617, Ser-635, Ser-1179) και σε επακόλουθη παραγωγή NO [152]. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της hHDL με τον SR-BI σε μία κυτταρική σειρά των HMVEC (Human Microvascular Endothelial Cells) ενεργοποίησε την eNOS μέσω αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων του κεραμιδίου. Ο μηχανισμός αυτός δεν περιλάμβανε αύξηση της φωσφορυλίωσης της AKT και των ενδοκυτταρικών επιπέδων του Ca^{2+} [153]. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης της hHDL στην eNOS μέσω του SR-BI περιλαμβάνει τη διατήρηση της eNOS στην καβεολίνη της πλασματικής μεμβράνης των

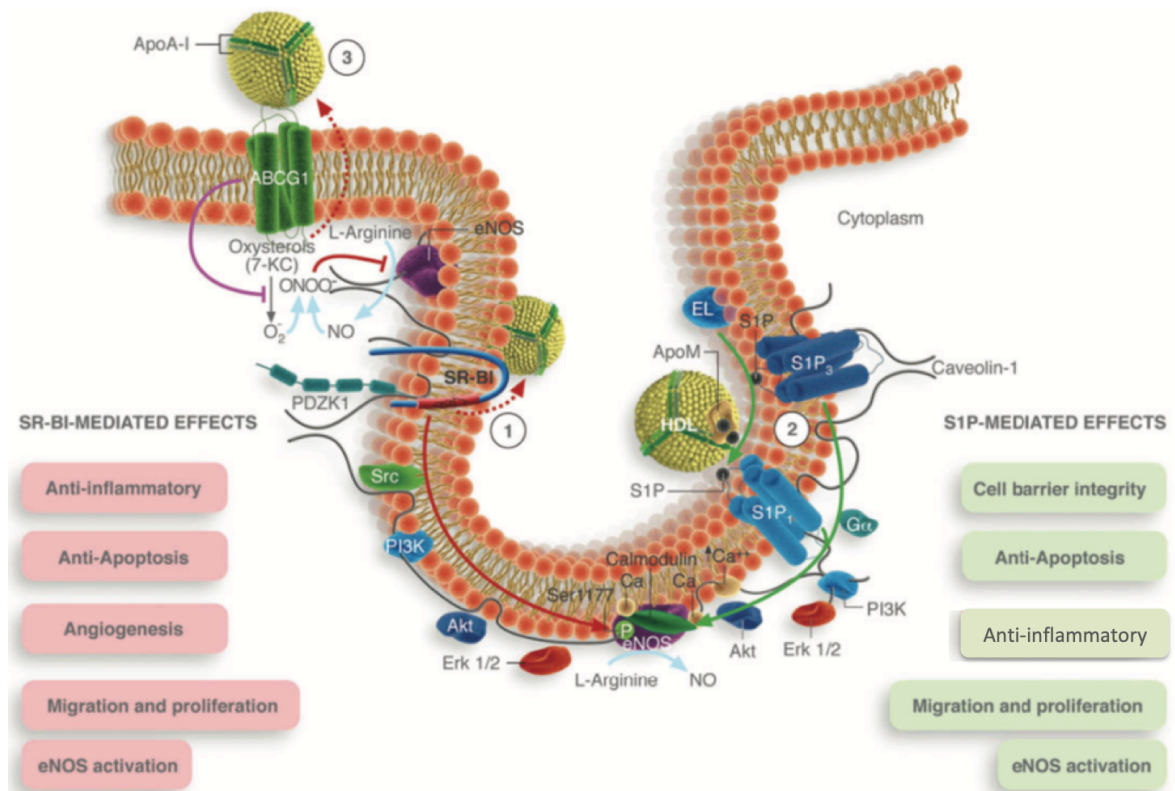
ενδοθηλιακών κυττάρων. Ειδικότερα, η hHDL εμπόδισε την επαγόμενη από την oxLDL μετατόπιση της eNOS από την καβεολίνη στα HUVEC και με τον τρόπο αυτό ανέστειλε την επακόλουθη μείωση στην ενεργοποίηση της eNOS. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την πρόσδεση της hHDL στον SR-BI η οποία οδήγησε σε επαγωγή της πρόσληψης ενδοκυτταρικών εστέρων χοληστερόλης, διατηρώντας έτσι τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στην καβεολίνη. Μέσω αυτού του μηχανισμού, η hHDL απέτρεψε την επαγόμενη από την oxLDL μείωση της χοληστερόλης στην καβεολίνη και την επακόλουθη εκτόπιση της eNOS από την καβεολίνη [154]. Εκτός από την ενεργοποίηση της eNOS και τη διατήρηση της υποκυτταρικής της τοπολογίας, η hHDL επάγει αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς όμως να αυξάνει τα mRNA επίπεδά της. Ειδικότερα, η hHDL αύξησε την πρωτεϊνική σταθερότητα της eNOS στα HAEC και στην κυτταρική σειρά των HUVEC EA.hy926 κύτταρα μέσω αύξησης του χρόνου ημιζωής της, η οποία οδήγησε στην επακόλουθη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός δράσης της hHDL περιλάμβανε την ενεργοποίηση των μονοπατιών PI3K/AKT και ERK1/2 καθοδικά της apoA-I [155].

In vivo μελέτες έχουν, επίσης, δείξει ότι η hHDL μέσω πρόσδεσης στον SR-BI επάγει την παραγωγή NO. Η hHDL αύξησε την παραγωγή του NO μέσω αλληλεπίδρασης της apoA-I με τον SR-BI και οδήγησε σε αγγειοδιαστολή σε αρτές από wt ποντίκια [149]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η χορήγηση hHDL αύξησε την αγγειοδιαστολή σε καρδιές από ποντίκια μέσω ενεργοποίησης της eNOS και επακόλουθης παραγωγής NO [156]. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η έγχυση rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία και σε άτομα με μειωμένα επίπεδα HDL πλάσματος βελτίωσε την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή μέσω αύξησης της δραστηριότητας της eNOS, η οποία οδήγησε σε αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα NO [157, 158].

Εκτός από την apoA-I, η HDL ενεργοποιεί την eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα δρώντας μέσω του λυσοσφιγγολιπιδίων S1P, SPC (sphingosylphosphorylcholine) και SF (Εικόνα 1.12). Το S1P της hHDL αλληλεπιδρά με τους GPCR (G-protein-coupled receptors) υποδοχείς S1P1 και S1P3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιεί καθοδικά τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή NO: α) το μονοπάτι Src/Rac1/PI3K/AKT και β) το μονοπάτι CaMKK/AMPK/PI3K/AKT. Και τα δύο μονοπάτια επάγουν τη φωσφορυλίωση της eNOS στη θέση Ser1179, με το μονοπάτι CaMKK/AMPK/PI3K/AKT να επάγει φωσφορυλίωση σε επιπλέον θέσεις [151, 152] [159]. Επιπλέον, η hHDL δρώντας μέσω των λυσοφωσφολιπιδίων S1P, SPC και SF οδήγησε σε επαγωγή της παραγωγής NO στα HUVEC. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την πρόσδεση του S1P ή SPC ή SF στον υποδοχέα

S1P3 και την επακόλουθη αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} στα HUVEC, η οποία ενεργοποίησε την AKT και οδήγησε στη φωσφορυλίωση της eNOS (στη θέση Ser1179). Μέσω των μηχανισμών αυτών, η hHDL αύξησε, επίσης, την παραγωγή NO σε δακτυλίους αορτής ποντικού και οδήγησε σε αγγειοδιαστολή [160]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η πρόσδεση του S1P της hHDL στον υποδοχέα S1P1 ή S1P3 ενεργοποίησε το μονοπάτι της PLC (phospholipase C) στα HPAEC (Human Placental Arterial Endothelial Cells) και επακόλουθα αύξησε τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του Ca^{2+} . Η αύξηση αυτή οδήγησε στην ενεργοποίηση της eNOS στα κύτταρα αυτά [161].

Η αλληλεπίδραση της hHDL με τον ABCG1 και η επακόλουθη εκροή χοληστερόλης έχειδειχθεί ότι επάγει την παραγωγή NO σε περιπτώσεις υπερχοληστερολαιμίας. Η hHDL εμπόδισε την παραγωγή ROS σε HAEC που εκτέθηκαν σε οξυστερόλη 7-KC (oxysterol 7-ketcholesterol) και με τον τρόπο αυτό εμπόδισε την επαγόμενη από την 7-KC μείωση της δραστηριότητας της eNOS. Ο μηχανισμός δράσης της hHDL περιλάμβανε την επαγωγή εκροής χοληστερόλης και 7-KC από τα HAEC (Human Aortic Endothelial Cells) μέσω του ABCG1 (Εικόνα 1.12) [162]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η αλληλεπίδραση της hHDL με τον ABCG1 οδήγησε σε εκροή χοληστερόλης από τα HAEC και τα πρωτογενή πνευμονικά ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικού που εκτέθηκαν σε χοληστερόλη. Ο μηχανισμός αυτός μείωσε την αλληλεπίδραση της eNOS με την καβεολίνη-1, η οποία οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα της eNOS. Μέσω αυτής της δράσης, η hHDL αποκατέστησε τη δραστηριότητα της eNOS στα HAEC [163]. Τέλος, το αντιοξειδωτικό ένζυμο PON1 της hHDL συμβάλει στην ικανότητά της να επάγει την παραγωγή NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αναστολή της δραστηριότητας της PON1 στην hHDL μείωσε την ενεργοποίηση της eNOS στα HAEC, η οποία οδήγησε σε μείωση της επαγόμενης από την hHDL παραγωγής του NO. Ομοίως, η HDL που απομονώθηκε από ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την PON1 δεν προκάλεσε επαγωγή της παραγωγής NO σε αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικού [164].



Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από την HDL καθοδικά του υποδοχέα SR-BI (1) ή S1P1/3 (2) ή του μεταφορέα ABCG1 (3) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μέσω των μονοπατιών αυτών, η HDL εκδηλώνει τις αθηροπροστατευτικές της λειτουργίες: αντιφλεγμονώδεις και αντιαποπτωτικές ιδιότητες, επαγωγή της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου και ενεργοποίηση της eNOS (τροποποιημένη από: [165]).

1.3.2.3 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL

1.3.2.3.1 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης, ο τραυματισμός του ενδοθηλίου του έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος από προφλεγμονώδους παράγοντες επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης και προφλεγμονωδών κυτταροκινών στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτές οι αλλαγές χαρακτηρίζουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και την επακόλουθη δυσλειτουργία του, η οποία οδηγεί στη μετανάστευση, διήθηση και συσσώρευση των μονοκυττάρων/μακροφάγων και T λεμφοκυττάρων στον έσω χιτώνα (Ενότητα 1.1.3.2) [6]. Οι αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της HDL στο ενδοθήλιο περιλαμβάνουν την αναστολή της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτταροκινών/χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης, τα οποία διευκολύνουν την είσοδο των μονοκυττάρων στον

υποενδοθηλιακό χώρο, καθώς και την επαγωγή της έκφρασης αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (Εικόνα 1.9).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL εμποδίζει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ποικίλων μηχανισμών (Εικόνα 1.12). In vitro μελέτες έδειξαν ότι η hHDL ή τα rHDL-apoA-I σωματίδια (σύμπλοκα haroA-I, φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) εμποδίζουν την επαγόμενη από τον TNF-α ή την IL-1 έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1 και E-σελεκτίνη στα HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) [166, 167]. Ομοίως, τα rHDL-apoA-I σωματίδια (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) και τα σύμπλοκα ενός συνθετικού πεπτιδίου μιμητή της haroA-I (5A) με φωσφατιδυλοχολίνη (5A/PC) μείωσαν την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 στα HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells). Ο μηχανισμός δράσης τους περιλάμβανε τη μείωση της επαγόμενης από τον TNF-α ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB στα κύτταρα αυτά [168]. Η αντιφλεγμονώδης δράση των 5A/PC συμπλόκων βρέθηκε ότι μεσολαβείται, επίσης, μέσω αλληλεπίδρασης με τον ABCA1 στα HCAEC. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τη συμβολή της εκροής χοληστερόλης στις αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες των 5A/PC συμπλόκων [169]. Ομοίως, η hHDL και τα rHDL-apoA-I σωματίδια (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) εμπόδισαν την επαγόμενη από τον TNF-α ενεργοποίηση του NF-κB και την καθοδική έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 στα HUVEC μέσω πρόσδεσης στον SR-BI και επακόλουθης ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT/eNOS, η οποία οδήγησε στην παραγωγή NO (Εικόνα 1.12) [170]. Επιπλέον, η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) εμπόδισαν την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση του VCAM-1 στα HUVEC και την επακόλουθη προσκόλληση των THP-1 μονοκυττάρων στα κύτταρα αυτά μέσω ενεργοποίησης της AMPK κινάσης, η οποία οδήγησε στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/eNOS/NO. Η ενεργοποίηση της AMPK πραγματοποιήθηκε μέσω ενεργοποίησης των κινασών CaMKK και LKB1 καθοδικά της αλληλεπίδρασης της apoA-I με τον υποδοχέα SR-BI [151].

Η HDL εμποδίζει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω επιπρόσθετων μηχανισμών που εξαρτώνται από τον SR-BI αλλά δεν περιλαμβάνουν την παραγωγή NO. Τα rHDL-apoA-I σωματίδια (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) και η hHDL εμπόδισαν την επαγόμενη από τον TNF-α ενεργοποίηση του NF-κB στα HCAEC και την επακόλουθη έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 μέσω πρόσδεσης στον SR-BI και καθοδικής αύξησης των επιπέδων της αναγωγάσης DHCR24 (3beta-hydroxysteroid-Delta 24 reductase). Η αύξηση αυτή οδήγησε στην επαγωγή της έκφρασης της HO-1 (heme

oxygenase-1) στα HCAEC μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT, ενός ενζύμου με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [171, 172]. Επιπροσθέτως, η hHDL μείωσε την επαγόμενη από το LPS αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα TLR4 (Toll-like receptors 4) στα HMEC (Human Microvascular Endothelial Cells) και η μείωση αυτή οδήγησε σε μειωμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ [173]. Επιπλέον, η hHDL μείωσε την επαγόμενη από το παλμιτικό αύξηση στην έκφραση των ICAM-1 και IL-6 στα HMEC [174]. Επιπροσθέτως, η hHDL εμπόδισε την επαγόμενη από την oxLDL παραγωγή του χημειοτακτικού παράγοντα των μονοκυττάρων MCP-1 σε μία κυτταρική σειρά των HUVEC, τα EA.hy926 κύτταρα [175]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL εμπόδισε την επαγόμενη από την oxLDL προσκόλληση των μονοκυττάρων στα HUVEC [176]. Επιπλέον, η rHDL-apoA-I μείωσε την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση των προφλεγμονωδών χημειοκινών CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2), CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5) και CXCL1 (C-X3-C motif chemokine ligand 1) στα HCAEC μέσω μείωσης της ενεργοποίησης του NF-κΒ μονοπατιού [177].

Εκτός από την apoA-I, η HDL εκδηλώνει τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της στα ενδοθηλιακά κύτταρα δρώντας μέσω των λυσοσφιγγολιπιδίων S1P, σφιγγοσυλοφωσφορυλοχολίνη (SPC) και λυσοσουλφατίδη (LSF, lysosulfatide), τα οποία αποτελούν συστατικά της (Εικόνα 1.12). Η hHDL κατέστειλε την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 στα HUVEC, εν μέρει, μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα S1P(1) από το S1P [170]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL ή η HDL που απομονώθηκε από πλάσμα wt ποντικών μείωσε την επαγόμενη από τον TNF-α ενεργοποίηση του NF-κΒ στα HUVEC και την επακόλουθη έκφραση του ICAM-1 μέσω ενός μηχανισμού που περιλάμβανε την πρόσδεση του S1P στον S1P(1) και το σχηματισμό ενός συμπλέγματος S1P(1)-β αρρεστίνης 2 στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών [178]. Επιπροσθέτως, η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα apoA-I/φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) εμπόδισαν την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση του VCAM-1 στα HUVEC και την επακόλουθη προσκόλληση των THP-1 μονοκυττάρων στα κύτταρα αυτά μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού CaMKK/AMPK/PI3K/AKT/eNOS/NO καθοδικά της αλληλεπίδρασης του S1P με τους υποδοχείς του [151]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL δρώντας διαμέσου των συστατικών της SPC και LSF εμπόδισε την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση της E-σελεκτίνης στα HUVEC μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT καθοδικά του υποδοχέα της SPC, S1P3 [179]. Επιπλέον, η hHDL δρώντας διαμέσου των S1P και SPC αύξησε την έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης TGF-β2 (transforming growth factor-β2) στα HUVEC μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT [180].

Εκτός από τα λυσοσφιγγολιπίδια, στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα εμπλέκονται, επίσης, τα φωσφολιπίδια που περιέχει. Μία μελέτη έδειξε ότι η ικανότητα των rHDL-αροΑ-I σωματιδίων (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) να εμποδίζουν την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση του VCAM-1 στα HUVEC πικοίλει ευρέως ανάλογα με τα διαφορετικά είδη της φωσφατυδυλοχολίνης (DPPC: 1-palmitoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PAPC: 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PLPC: 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) που περιέχονται στα σωματίδια αυτά, τα οποία αποτελούν τα πιο άφθονα φωσφολιπίδια της hHDL. Ειδικότερα, τα σωματίδια που περιείχαν PLPC και PAPC μείωσαν σημαντικά την έκφραση του VCAM-1 στα HUVEC, ενώ πολύ μικρότερη ή καθόλου μείωση προκλήθηκε από τα σωματίδια που περιείχαν POPC και DPPC, αντίστοιχα [181].

1.3.2.3.2 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της HDL στα μονοκύτταρα

Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η HDL εκδηλώνει αντιφλεγμονώδη δράση μέσω επίδρασης στα μονοκύτταρα (Εικόνα 1.9). Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος και την αθηροσκλήρωση (Ενότητα 1.1.2) [6]. In vitro μελέτες έδειξαν ότι η HDL μειώνει τη φλεγμονώδη απόκριση στα μονοκύτταρα και την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών μέσω ποικίλων μηχανισμών. Η hHDL, η ελεύθερη λιπιδίων αροΑ-I που απομονώθηκε από πλάσμα υγιών ατόμων (haroA-I) και τα rHDL-αροΑ-I σωματίδια (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) μείωσαν την επαγόμενη από το LPS έκφραση και ενεργοποίηση του μορίου προσκόλλησης CD11b στα ανθρώπινα πρωτογενή μονοκύτταρα. Αυτό οδήγησε σε μείωση της προσκόλλησης των μονοκυττάρων στα HCAEC, καθώς και σε μειωμένη μετανάστευση των μονοκυττάρων. Η παρατηρούμενη αντιφλεγμονώδης δράση της αροΑ-I και της hHDL αποδόθηκε στην αλληλεπίδραση με τον ABCA1 και SR-BI, αντίστοιχα, στα μονοκύτταρα. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν τη συνεισφορά της εκροής χοληστερόλης από τα μονοκύτταρα στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των αροΑ-I και hHDL [182]. Επιπροσθέτως, η rHDL-αροΑ-I μείωσε την έκφραση των προφλεγμονωδών χημειοκινών CCL2, CCL5 και CX(3)CL1 στα ανθρώπινα πρωτογενή μονοκύτταρα μέσω μείωσης της ενεργοποίησης του NF-κΒ μονοπατιού. Μειωμένη έκφραση παρατηρήθηκε, επίσης, στους υποδοχείς των χημειοκινών αυτών CCR2 (C-C motif chemokine receptor 2) και CX(3)CR1 (C-X3-C motif chemokine receptor 1), αντίστοιχα. Η rHDL-αροΑ-I μείωσε την έκφραση του CX(3)CR1 (αλλά όχι του CCR2) μέσω ενός μηχανισμού που περιλάμβανε την ενεργοποίηση του PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) [177]. Τέλος, η hHDL εμπόδισε την

επαγόμενη από τις γκρανουλίνες επαγωγή της έκφρασης των TNF- α και IL-1 β στα ανθρώπινα μακροφάγα. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την πρόσδεση της apoA-I της hHDL στην προγκρανουλίνη, η οποία παράγεται από τα μακροφάγα, και την επακόλουθη καταστολή της μετατροπής της προγκρανουλίνης στις προφλεγμονώδεις γκρανουλίνες [183].

1.3.2.3.3 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της HDL στα VSMCs

Η HDL εκδηλώνει, επίσης, την αντιφλεγμονώδη δράση της μέσω μείωσης της φλεγμονώδους απόκρισης στα VSMCs. Η hHDL μείωσε την επαγόμενη από θρομβίνη παραγωγή του MCP-1 στα πρωτογενή αορτικά VSMCs αρουραίου. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την αλληλεπίδραση των λυσοσφιγγολιπιδίων S1P και SPC της hHDL με τους υποδοχείς S1P1 και S1P3 [184]. Επιπλέον, η hHDL εμπόδισε την επαγόμενη από τον TNF- α έκφραση των προφλεγμονωδών γονιδίων iNOS (inducible NOS) και MMP-9 στα αορτικά VSMCs ποντικού. Ο μηχανισμός δράσης της hHDL περιλάμβανε τη μείωση της ενεργοποίησης του NF- κ B μέσω πρόσδεσης του S1P στον υποδοχέα S1P2 [185].

1.3.2.3.4 Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL in vivo

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες in vivo σε ζωικά μοντέλα φλεγμονής. Η έγχυση rHDL-apoA-I σωματιδίων (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) ή 5A/PC συμπλόκων σε κουνέλια στα οποία κατόπιν προκλήθηκε οξεία φλεγμονή στην καρωτίδα μείωσε τη διήθηση των κυκλοφορούντων ουδετεροφύλων στον έσω χιτώνα, καθώς και την έκφραση των VCAM-1, ICAM-1 και MCP-1 στο ενδοθήλιο του έσω χιτώνα [168] [186]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, σε apoE^{-/-} ποντίκια στα οποία προκλήθηκε τραυματισμός της καρωτίδας, η έγχυση rHDL-apoA-I σωματιδίων (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) μείωσε τη διήθηση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων/μακροφάγων στον έσω χιτώνα και την έκφραση του VCAM-1 στο ενδοθήλιο του έσω χιτώνα [187]. Επιπλέον, η hHDL μείωσε την επαγόμενη από τη θρομβίνη παραγωγή του MCP-1 σε αορτές ποντικών. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την ενεργοποίηση του υποδοχέα S1P3 μετά από πρόσδεση του S1P ή SPC της hHDL. Ωστόσο, η πρόσδεση της hHDL στον SR-BI ήταν, επίσης, απαραίτητη για τη μείωση της παραγωγής του MCP-1. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ένα μηχανισμό αντιφλεγμονώδους δράσης της hHDL in vivo που εμπλέκει τη συντονισμένη σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων S1P3 και SR-BI [184].

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL in vivo έχουν επιβεβαιωθεί και σε κλινικές μελέτες. Η χορήγηση rHDL-apoA-I σωματιδίων (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε

ασθενείς με διαβήτη τύπου II μείωσε την έκφραση του CD11b στα περιφερικά μονοκύτταρα και την προσκόλληση των ουδετεροφίλων, τα οποία απομονώθηκαν από τους ασθενείς, στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*. Επιπροσθέτως, η χορήγηση rHDL-αροΑ-I βελτίωσε τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL που απομονώθηκε από το πλάσμα των ασθενών αυτών. Ειδικότερα, η HDL που απομονώθηκε μετά από έγχυση rHDL-αροΑ-I για 4 έως 72h κατέστειλε την έκφραση του VCAM-1 στα HCAEC [188].

1.3.2.4 Η αντιαποπτωτική δράση της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος αποτελεί χαρακτηριστικό της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και στην παθοφυσιολογία της CAD (Ενότητες 1.1.2, 1.1.3.2). Υψηλός ρυθμός απόπτωσης του ενδοθηλίου έχει παρατηρηθεί σε αθηροσκλήρωση, CAD και CVD [189, 190]. Ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ότι η hHDL εμποδίζει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. TNF-α), oxLDL και άλλους προαθηρογόνους παράγοντες [191-194]. Επομένως, η ικανότητα της HDL να προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από απόπτωση αντιπροσωπεύει μία από τις πολυάριθμες αθηροπροστατευτικές της ιδιότητες (Εικόνες 1.12, 1.13).

Η HDL μειώνει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ποικίλων μηχανισμών που ενεργοποιούνται καθοδικά της πρόσδεσης της αροΑ-I στον SR-BI (Εικόνα 1.12). Η hHDL και η rHDL-αροΑ-I (σύμπλοκα hαροΑ-I/φωσφατυδυλοχολίνης/χοληστερόλης) εμπόδισαν την επαγόμενη από την oxLDL αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου Ca^{2+} και την επακόλουθη παραγωγή ROS στα HMEC, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την απόπτωση. Ειδικότερα, η hHDL εμπόδισε την επαγόμενη από την oxLDL απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Επίσης, η αναστολή της επαγόμενης από την oxLDL απελευθέρωσης του AIF (apoptosis-inducing factor) από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα συνέβαλε στην αντιαποπτωτική δράση της hHDL στα HMEC [192] [195]. Η αλληλεπίδραση της αροΑ-I με τον SR-BI συνέβαλε σε σημαντικό βαθμό στην παρατηρούμενη αντιαποπτωτική δράση της hHDL στα HMEC, καθώς αυτή αποδόθηκε κατά 70% στην αροΑ-I μέσω της ικανότητάς της να προσλαμβάνει τα υδροϋπεροξειδία των φωσφολιπιδίων (PLOOH) της oxLDL [192]. Επιπροσθέτως, η hHDL μείωσε την απόπτωση στα HAEC που προκλήθηκε από τον TNF-α ή τη στέρηση ορού/αυξητικών παραγόντων μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT και επακόλουθης αύξησης της έκφρασης του αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xL, η οποία οδήγησε σε μειωμένη ενεργότητα της

κασπάσης 3. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η ικανότητα της hHDL να μειώνει την απόπτωση στα HAEC μεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω αλληλεπίδρασης με τον SR-BI. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός ήταν ανεξάρτητος της ενεργοποίησης της eNOS και της παραγωγής NO, με σημαντικό ρόλο να παίζει η apoJ [196]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η αλληλεπίδραση της hHDL με τον SR-BI μείωσε την απόπτωση στα HUVEC η οποία προκλήθηκε από στέρηση ορού/αυξητικών παραγόντων [197].

Εκτός από τον SR-BI, στην αντιαποπτωτική δράση της HDL εμπλέκεται η αλληλεπίδραση της apoA-I με τον επιφανειακό υποδοχέα F1-ATPase των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η πρόσδεση της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I στον F1-ATPase εμπόδισε την απόπτωση στα HUVEC που προκλήθηκε από στέρηση ορού/αυξητικών παραγόντων. Ωστόσο ο εμπλεκόμενος μηχανισμός δεν προσδιορίστηκε [197].

Εκτός από την apoA-I, η αντιαποπτωτική δράση της HDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα μεσολαβείται και μέσω των λυσοσφιγγολιπιδίων που περιέχει (Εικόνα 1.12). Η hHDL εμπόδισε την απόπτωση στα HUVEC που προκλήθηκε από στέρηση ορού/αυξητικών παραγόντων δρώντας μέσω των SPC και LSF. Ειδικότερα, η αντιαποπτωτική δράση της hHDL στα HUVEC περιλάμβανε τους εξής μηχανισμούς: 1) διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης του μιτοχονδρίου και αναστολή της παραγωγής ROS, με αποτέλεσμα την αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c στο κυταρρόπλασμα και της επακόλουθης ενεργοποίησης των κασπασών 3 και 9, 2) ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT που εμπόδισε την επαγόμενη από το κυτόχρωμα c ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 9. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT οδήγησε, επίσης, στη φωσφορυλίωση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAD, εμποδίζοντας την έτσι να δεσμεύσει την Bcl-xL και να την απενεργοποιήσει [194]. Επιπλέον, η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα hapoA-I/φωσφατιδυλοχολίνης/χοληστερόλης/S1P) αύξησαν την επιβίωση στα HUVEC και εμπόδισαν την απόπτωση που προκλήθηκε από στέρηση ορού/αυξητικών παραγόντων ή oxLDL μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού ERK1/2. Η ενεργοποίηση αυτή έλαβε χώρα καθοδικά της πρόσδεσης του S1P στον υποδοχέα S1P1 [198, 199]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL εμπόδισε την απόπτωση στα HUVEC που προκλήθηκε από στέρηση ορού/αυξητικών παραγόντων και αύξησε την επιβίωση μέσω πρόσδεσης του S1P στους υποδοχείς S1P1 και S1P3. Εκτός από την ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2, ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε και την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT καθοδικά των αλληλεπιδράσεων S1P/S1P1 και S1P/S1P3. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών οδήγησε σε καταστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης 3 στα HUVEC [200].

Εκτός από τα λυσοσφιγγολιπίδια, τα πλασμαγόνα/πλασμαλογόνα, μία υποκατηγορία φωσφολιπιδίων που περιέχονται σε χαμηλό ποσοστό στην hHDL, εμπόδισαν, επίσης, την απόπτωση στα HUVEC που προκλήθηκε από στέρηση ορού [201].

Σε συμφωνία με τα προαναφερόμενα in vitro ευρήματα, η HDL παρουσιάζει αντιαποπτωτική δράση in vivo. Για παράδειγμα, η έγχυση hHDL σε apoE^{-/-} ποντίκια μείωσε την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων της αορτής [196].

1.3.2.5 Η HDL επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό

Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος και η επακόλουθη διατάραξη της ενδοθηλιακής ακεραιότητας αποτελεί το εναρκτήριο βήμα για την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (Ενότητα 1.1.3.2). Η HDL επάγει την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου προωθώντας τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των τοπικών γειτονικών ενδοθηλιακών κυττάρων, την προσέλευση των EPC (Endothelial Progenitor Endothelial Cells) από το μυελό των οστών στην περιοχή του αγγειακού τραυματισμού, καθώς και την αγγειογένεση (Εικόνα 1.9) [103] [202-204].

1.3.2.5.1 Η HDL επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι μία διαδικασία κλειδί για την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό in vivo και μεσολαβείται είτε από τα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα στην περιοχή της αρτηριακής βλάβης ή από τα EPC που προέρχονται από το μυελό των οστών ή τους περιφερειακούς ιστούς [205-207]. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL δρώντας μέσω της apoA-I επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ενεργοποιώντας ποικίλους μηχανισμούς καθοδικά του SR-BI (Εικόνα 1.12). Η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) ενεργοποίησαν το μονοπάτι CaMKK-LKB1/AMPK/PI3K/AKT στα HUVEC μέσω αλληλεπίδρασης της apoA-I με τον SR-BI και οδήγησαν σε επαγωγή της κυτταρικής μετανάστευσης [151]. Επιπροσθέτως, η πρόσδεση της hHDL στον SR-BI μέσω της apoA-I οδήγησε στη φωσφορυλίωση της Src κινάσης, στην ενεργοποίηση της eNOS και στην επαγωγή της μετανάστευσης στα BAEC (Bovine Aortic Endothelial Cells). Η αλληλεπίδραση του SR-BI με την πρωτεΐνη PDZK1 ήταν απαραίτητη για την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών αυτών μορίων [208]. Ωστόσο, η HDL δρώντας διαμέσου του SR-BI μπορεί να επάγει μετανάστευση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που είναι ανεξάρτητος της ενεργοποίησης της eNOS. Ειδικότερα, η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης/χοληστερόλης) αύξησαν τη μετανάστευση στα

BAEC μέσω ενεργοποίησης της Rac1-GTPase, η οποία οδήγησε σε αναδιάταξη του κυτταρασκελετού της ακτίνης και επακόλουθο σχηματισμό λαμελιποδίων. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την ενεργοποίηση της Src κινάσης καθοδικά της πρόσδεσης της apoA-I στον SR-BI και την επακόλουθη φωσφορυλίωση της PI3K, η οποία οδήγησε στην ενεργοποίηση των κινασών AKT και MEK/ERK1/2 [209]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης/χοληστερόλης) αύξησαν τη μετανάστευση των HUVEC μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών PI3K/AKT και MEK1/2/ERK1/2 [210, 211].

Εκτός από την apoA-I, η HDL επάγει μετανάστευση στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιώντας ποικίλους μηχανισμούς μέσω του S1P (Εικόνα 1.12). Η hHDL δρώντας μέσω του S1P και των GPCR υποδοχέων του ενεργοποίησε το μονοπάτι CaMKK/AMPK/PI3K/AKT στα HUVEC και οδήγησε σε επαγωγή της κυτταρικής μετανάστευσης [151]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης/χοληστερόλης/S1P) αύξησαν τη μετανάστευση των HUVEC μέσω αλληλεπίδρασης του S1P με τον υποδοχέα S1P1 ή S1P3. Η αλληλεπίδραση αυτή οδήγησε σε επακόλουθη ενεργοποίηση των μονοπατιών PI3K/AKT, PI3K/Rac-GTPase/p38 MAPK και Rho-GTPase/ROCK [198]. Επιπλέον, η πρόσδεση του S1P της HDL στον S1P3 αύξησε την έκφραση και ενεργοποίηση του VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2) στα HUVEC, η οποία οδήγησε σε επαγωγή της κυτταρικής μετανάστευσης. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των AKT, eNOS και p38 MAPK στα HUVEC μετά από έκθεση στην HDL [204].

1.3.2.5.2 Η HDL επάγει την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου in vivo

Ποικίλες μελέτες σε ζωικά μοντέλα που υπέστησαν τραυματισμό του ενδοθηλίου της καρωτίδας ή μοντέλα αθηροσκλήρωσης έχουν δείξει ότι η μετανάστευση των κυκλοφορούντων EPC που προέρχονται από το μυελό των οστών στην περιοχή του αγγειακού τραυματισμού συμβάλει στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, στην αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου και στην πρόληψη της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης [212-215]. Η HDL επάγει τη μετανάστευση των κυκλοφορούντων EPC και την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου in vivo (Εικόνα 1.9). Η έγχυση rHDL-apoA-I σωματιδίων (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) ή apoA-I που προήλθε από απολιπιδικωμένη HDL (preβ-HDL σωματίδια) σε ζωικά μοντέλα που υπέστησαν τραυματισμό της καρωτίδας ή μοντέλα αθηροσκλήρωσης αύξησε τα επίπεδα των κυκλοφορούντων EPC και τη μετανάστευσή τους στην περιοχή της τραυματισμένης αρτηρίας, και μέσω των μηχανισμών αυτών οδήγησε σε αποκατάσταση του

τραυματισμένου ενδοθηλίου [202] [216, 217]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η HDL που απομονώθηκε από το πλάσμα διαγονιδιακών ποντικών με υπέκφραση της γονιδίου της haroA-I αύξησε τη μετανάστευση των πρωτογενών EPC ποντικού μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού MEK1/2/ERK1/2 καθοδικά του SR-BI και επακόλουθης παραγωγής NO [218]. Τέλος, η έγχυση rHDL-αροA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II αύξησε τα επίπεδα των κυκλοφορούντων EPC [219].

1.3.2.5.3 Η HDL επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων

Ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων συμβάλλει στην αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό και στη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας *in vivo* [220]. Η HDL επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων δρώντας μέσω της αροA-I και του S1P (Εικόνα 1.12). Η HDL αύξησε τον πολλαπλασιασμό των HUVEC μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} και την παραγωγή της PGI2 [221]. Επιπλέον, η hHDL και η rHDL-αροA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) ενεργοποίησαν το μονοπάτι Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 στα HUVEC μέσω αλληλεπίδρασης της αροA-I με τον SR-BI, το οποίο οδήγησε σε επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [151] [210]. Επιπροσθέτως, η hHDL αύξησε τον πολλαπλασιασμό στα HUVEC μέσω πρόσδεσης της αροA-I στον επιφανειακό υποδοχέα ecto-F1-ATPase. Η πρόσδεση αυτή οδήγησε σε ενεργοποίηση του υποδοχέα P2Y1-ADP και καθοδική ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3Kβ/AKT. Εκτός από τον ecto-F1-ATPase, η ικανότητα της hHDL να επάγει πολλαπλασιασμό στα HUVEC αποδόθηκε και στον SR-BI [222]. Επιπλέον, η hHDL δρώντας μέσω του S1P και των GPCR υποδοχέων του ενεργοποίησε το μονοπάτι Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 στα HUVEC και οδήγησε σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [151]. Ομοίως, η πρόσδεση του S1P της hHDL στους υποδοχείς S1P1 και S1P3 οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού στα HPAEC μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού ERK1/2 [161]. Τέλος, η πρόσδεση του S1P της HDL στον S1P3 οδήγησε σε επαγωγή του πολλαπλασιασμού στα HUVEC μέσω αύξησης της έκφρασης και της ενεργοποίησης του VEGFR2. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των AKT και eNOS στα κύτταρα αυτά μετά από έκθεση στην HDL [204].

1.3.2.5.4 Η HDL επάγει τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την επαγόμενη από υποξία αγγειογένεση

Η διαφοροποίηση των EPC που μεταναστεύουν στην περιοχή του αγγειακού τραύματος σε ώριμα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλει στην αποκατάσταση του τραυματισμένου

ενδοθηλίου [220]. Η HDL επάγει τη διαφοροποίηση των EPC και άλλων ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*. Η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) προώθησε τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων EPC μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT [223]. Επιπλέον, η hHDL δρώντας μέσω του S1P ενεργοποίησε το μονοπάτι Ras/Raf-1/MEK1/2/ERK1/2 στα HCAEC και οδήγησε σε επαγωγή της διαφοροποίησης [224, 225]. Η πρόσδεση του S1P της HDL στον υποδοχέα S1P3 οδήγησε, επίσης, σε επαγωγή της διαφοροποίησης στα HUVEC μέσω αύξησης της έκφρασης και της ενεργοποίησης του VEGFR2 [204].

Εκτός από τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*, η HDL επάγει την αγγειογένεση που προκαλείται από υποξία *in vivo* [203] [226]. Η επαγόμενη από υποξία αγγειογένεση είναι κριτικής σημασίας για τη νεοαγγείωση σε ιστούς μετά από ισχαιμική βλάβη, η οποία προκαλείται σε παθολογικές περιπτώσεις, όπως το AMI [227]. Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν ότι η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) επάγει την επαγόμενη από υποξία αγγειογένεση ενώ εμποδίζει την αγγειογένεση που προκαλείται από φλεγμονή (TNF-α), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας [226] [228]. Η μοριακή βάση της διαφορετικής δράσης της rHDL-apoA-I συσχετίστηκε με τη ρύθμιση των HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha), VEGF (Vascular endothelial growth factor) και VEGFR2, τα επίπεδα των οποίων αυξήθηκαν από την rHDL-apoA-I σε απόκριση στην υποξία, ενώ μειώθηκαν από αυτή σε απόκριση στον TNF-α [228]. Η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) προώθησαν την επαγόμενη από υποξία αγγειογένεση μέσω του SR-BI και της μεταμεταφραστικής ρύθμισης του HIF-1α. Ο μηχανισμός δράσης περιλάμβανε το μονοπάτι SR-BI/PI3K/AKT, τις E3 λιγάσες ουμπικουτίνης Siah1 και Siah2 και τις πρότυλο-υδρολάσες PHD2 και PHD3, και οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του VEGF [203] [229]. Επιπλέον, η έγχυση rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε μοντέλα ποντικών με διαταραγμένη αγγειογένεση μετά από πρόκληση ισχαιμίας αποκατέστησε την ανάκτηση της αιματικής ροής και την πυκνότητα των τριχοειδών αγγείων, καθώς και την αγγειογένεση στην περιοχή του τραύματος. Οι δράσεις αυτές της rHDL-apoA-I συσχετίστηκαν με τη ρύθμιση των VEGF, VEGFR2 και HIF-1α καθοδικά του SR-BI [229, 230].

1.3.2.6 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL

Η συσσωρευμένη oxLDL στον υποενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση καθώς επάγει την έκφραση φλεγμονωδών μορίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων στον έσω χιτώνα (Ενότητα 1.1.3.2) [231, 232]. Η HDL μπορεί να εμποδίσει την οξείδωση της LDL μέσω ποικίλων

μηχανισμών (Εικόνα 1.9). Η HDL εμποδίζει άμεσα την οξείδωση της LDL μέσω μεταφοράς των προϊόντων οξείδωσης, όπως λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH), από την LDL στην HDL [233]. Η μεταφορά αυτή μπορεί να γίνει απευθείας μεταξύ των μονοστοιβάδων των φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών, είτε αυθόρμητα ή μεσολαβείται από πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, όπως η CEPT [234]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL της κυκλοφορίας συσσωρεύει οξειδωμένα φωσφολιπιδία, όπως LOOH, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και F2-ισοπροστάνια, και αποτελεί τον κύριο μεταφορέα τους [233] [235]. Η apoA-I παίζει σημαντικό ρόλο στις αντιοξειδωτικές δράσεις της HDL, καθώς προσδένεται στα LOOH και τα απομακρύνει από την LDL *in vitro* και *in vivo* [236].

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL εμποδίζει την οξείδωση της LDL *in vitro* και *in vivo* [237, 238]. Η έκθεση ανθρώπινων κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος σε ηHDL κατέστησε τα κύτταρα ανίκανα να οξειδώσουν την LDL [239]. Η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης POPC) εμπόδισε την οξείδωση της LDL στον ίδιο βαθμό με την ηHDL, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ρόλο για την apoA-I [240]. Μελέτες *in vivo* έχουν, επίσης, δείξει ότι η HDL έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μειώνει το οξειδωτικό στρες. Η έγχυση rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε κουνέλια και apoE -/- ποντίκια στα οποία προκλήθηκε τραυματισμός της καρωτίδας εμπόδισε την αύξηση των ROS στο αρτηριακό τοίχωμα και μείωσε το σχηματισμό οξειδωτικά τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών στον έσω χιτώνα [186, 187]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η έγχυση rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) ή 5A/PC συμπλόκων σε κουνέλια στα οποία κατόπιν προκλήθηκε οξεία φλεγμονή στην καρωτίδα μείωσε την παραγωγή και την έκφραση των καταλυτικών υπομονάδων Nox4 της NADPH οξειδάσης στον έσω χιτώνα, η οποία αποτελεί την κύρια πηγή ROS στα αγγεία [168].

Εκτός από την apoA-I, η HDL περιέχει άλλες απολιποπρωτεΐνες που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, όπως η apoA-II, η apoA-IV, η apoE, η apoM και η apoJ [103] [241]. Η HDL εμπλουτισμένη σε apoA-II που απομονώθηκε από διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση του γονιδίου της haroA-II εμπόδισε την οξείδωση της VLDL [242]. Επιπλέον, η υπερέκφραση της haroA-IV σε apoE -/- ποντίκια μείωσε την περιεκτικότητα της oxLDL στις αθηρωματικές πλάκες της καρδιάς [243]. Επιπροσθέτως, η apoJ που είναι προσδεσμένη στην ηHDL εμπόδισε την οξείδωση της LDL στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [244]. Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της apoE περιγράφονται στην Ενότητα 1.5.5.3.

Εκτός από την apoA-I, η HDL εκδηλώνει αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro* και *in vivo* δρώντας μέσω των λυσοσφιγγολιπιδίων S1P και SPC. Η hHDL εμπόδισε την επαγόμενη από θρομβίνη ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης στα πρωτογενή αορτικά VSMCs αρουραίου και οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή ROS. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την αλληλεπίδραση των S1P και SPC της hHDL με τους υποδοχείς S1P(1) και S1P(3) των VSMCs, η οποία οδήγησε σε μειωμένη ενεργοποίηση της Rac-1 [184]. Σε συμφωνία με τα *in vitro* ευρήματα, η hHDL δρώντας μέσω των S1P και SPC μείωσε την επαγόμενη από τη θρομβίνη παραγωγή ROS σε αορτές από ποντίκια. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε της ενεργοποίηση του S1P(3) μετά από πρόσδεση του S1P ή SPC της hHDL. Ωστόσο, η πρόσδεση της hHDL στον SR-BI ήταν, επίσης, απαραίτητη για τη μείωση της παραγωγής ROS. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ένα μηχανισμό αντιοξειδωτικής δράσης της hHDL *in vivo* που εμπλέκει τη συντονισμένη σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων S1P3 και SR-BI [184].

Εκτός από τις απολιποπρωτεΐνες και τα λυσοσφιγγολιπίδια, η HDL μπορεί να δράσει αντιοξειδωτικά και μέσω των αντιοξειδωτικών ενζύμων που περιέχει, όπως η PON1, η LCAT και η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-ακετυλοϋδρολάση, PAF-AH). Τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στην καταστολή της οξείδωσης των λιπιδίων ή στην αποικοδόμηση των LOOH [76] [103] [245]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα της HDL να εμποδίζει την οξείδωση της LDL οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στην PON1 [175] [245]. Η HDL που δεν περιείχε PON1 ήταν ανίκανη να εμποδίσει την οξείδωση της LDL στα EA.hy926 κύτταρα [175]. Ομοίως, η απενεργοποίηση της PON1 στην HDL μείωσε την ικανότητα της HDL να εμποδίζει την οξείδωση της LDL στα HAEC, PAEC (Porcine Aortic Endothelial Cells) και RAEC (Rabbit Aortic Bovine Aortic Endothelial Cells) [245].

1.3.2.7 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL

Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στο σχηματισμό θρόμβου που οδηγούν στη γρήγορη απόφραξη του αγγείου και τις επακόλουθες κλινικές επιπλοκές (Ενότητα 1.1.2) (Εικόνα 1.1). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ενδοθήλιο του αγγειακού τοιχώματος παρουσιάζει αντιθρομβωτικές και ινωδολυτικές ιδιότητες, ενώ ο τραυματισμός του ενδοθηλίου επάγει θρομβωτική απόκριση. Ποικίλες *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η HDL εμποδίζει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη θρόμβωση (Εικόνα 1.9). Η έγχυση rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε υγιή άτομα που έλαβαν χαμηλά επίπεδα ενδοτοξίνης (LPS) μείωσε την προθρομβωτική και προπηκτική της δράση και επακόλουθα εμπόδισε την ενεργοποίηση της πήξης του αίματος [246].

Ποικίλοι μηχανισμοί εμπλέκονται στην αντιθρομβωτική δράση της HDL, με τον κυριότερο να αποτελεί η ικανότητά της να επάγει τη σύνθεση της PGI₂ στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η PGI₂ δρα ως αγγειοδιασταλτικός παράγοντας και σε συνδυαστική δράση με το NO επάγουν τη χαλάρωση των VSMCs, εμποδίζουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και μειώνουν την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων που προωθούν τον τοπικό πολλαπλασιασμό των VSMCs (Εικόνα 1.9). Η έκθεση hHDL σε BAEC, HUVEC και ενδοθηλιακά κύτταρα θωρακικής αορτής χοίρου οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής PGI₂ [221] [247, 248]. Ομοίως, πειράματα με rHDL και απολιπιδιωμένες μορφές HDL σε ενδοθηλιακά κύτταρα θωρακικής αορτής χοίρου έδειξαν ότι τόσο οι απολιποπρωτεΐνες όσο και τα λιπίδια που περιέχονται στην hHDL είναι απαραίτητα για την επαγωγή της σύνθεσης PGI₂ [249]. Η έγχυση hHDL ή rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε καρδιές που απομονώθηκαν από αρουραίους πριν την επαγωγή ισχαιμίας αύξησε την επαγόμενη από ισχαιμία σύνθεση της PGI₂ [250]. Ομοίως, η έγχυση hHDL σε καρδιές που απομονώθηκαν από κουνέλια οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή PGI₂ [251]. Η επαγόμενη από την HDL σύνθεση PGI₂ στο ενδοθήλιο *in vitro* και *in vivo* μεσολαβείται μέσω αύξησης της παραγωγής του αραχιδονικού οξέος και της έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης 2 (Cox-2, cyclooxygenase-2) [247, 248] [251-253].

Η HDL επάγει την έκφραση της Cox-2 και την επακόλουθη παραγωγή της PGI₂ στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ποικίλων μηχανισμών που περιλαμβάνουν τους υποδοχείς SR-BI, S1P3 και S1P2 και τον ABCA1. Η hHDL δρώντας μέσω της apoA-I και του ABCA1 ενεργοποίησε τα μονοπάτια p38 MAPK, ERK1/2 και JAK2 (c-Jun N-terminal kinase-2) στα HUVEC και οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της Cox-2 και της παραγωγής PGI₂. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL αύξησε την έκφραση της Cox-2 και οδήγησε σε επακόλουθη επαγωγή της παραγωγής PGI₂ στα HUVEC μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα CREB καθοδικά της p38 MAPK [252]. Επιπροσθέτως, η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/eNOS καθοδικά του SR-BI έχει δειχθεί ότι συμβάλει στην αύξηση της έκφρασης της Cox-2 και της επακόλουθης σύνθεσης PGI₂ που επάγεται από την hHDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα [254]. Επιπλέον, η hHDL δρώντας μέσω του S1P και των GPCR υποδοχέων του αύξησε την έκφραση της Cox-2 και τη σύνθεση PGI₂ στα HUVEC [255]. Η hHDL δρώντας, επίσης, μέσω του S1P και του υποδοχέα S1P3 ή S1P2 ενεργοποίησε τα μονοπάτια p38 MAPK/CREB, ERK1/2 και JNK-1 στα ανθρώπινα VSMCs και οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της Cox-2 και στην επακόλουθη επαγωγή της σύνθεσης PGI₂ [256-258].

Εκτός από την παραγωγή της PGI₂, η HDL εκδηλώνει τις αντιθρομβωτικές της ιδιότητες επηρεάζοντας την έκφραση προθρομβωτικών μεσολαβητών (όπως, ο TF και ο αναστολέας του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου τύπου 1 (PAI-1)) και αντιθρομβωτικών παραγόντων (όπως, ο TFPI (tissue factor pathway inhibitor) και ο t-PA), οι οποίοι εμπλέκονται στη θρόμβωση και ινωδόλυση. Η hHDL εμπόδισε την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση των TF και PAI-1 και αύξησε την έκφραση του TFPI στα HAEC. Παράλληλα, η hHDL οδήγησε σε αυξημένη απελευθέρωση του t-PA από τα κύτταρα αυτά. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την ενεργοποίηση του μονοπατιού AKT/eNOS/NO στα HAEC καθοδικά του SR-BI [259]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η hHDL και η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) εμπόδισαν την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση και ενεργότητα του TF στα HUVEC και HAEC μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του p38 MAPK μονοπατιού και επαγωγής της ενεργοποίησης του PI3K/AKT μονοπατιού καθοδικά του SR-BI [260]. Επιπλέον, η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) μείωσε την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του TF στα HUVEC μέσω αναστολής της ενεργοποίησης της RhoA-GTPase και επαγωγής της ενεργοποίησης της PI3K κινάσης. Ωστόσο, ο εμπλεκόμενος μηχανισμός δεν περιλάμβανε την ενεργοποίηση του μονοπατιού AKT/eNOS [261]. Η hHDL και η rHDL-apoA-I εμπόδισαν, επίσης, την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση του TF στα THP-1 μονοκύτταρα [260]. Σε συμφωνία με τα *in vitro* ευρήματα, η έγχυση hHDL σε ποντίκια που υπέστησαν τραυματισμό της καρωτίδας ανέστειλε την ενεργότητα των TF και PAI-1 στην καρωτίδα και καθυστέρησε σημαντικά το χρόνο σχηματισμού θρόμβου [259].

Η HDL προστατεύει από τη θρόμβωση εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η χορήγηση rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης) σε υγιείς ανθρώπους εμπόδισε την επαγόμενη από το LPS συσσώρευση αιμοπεταλίων [246]. Η HDL εμποδίζει την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω ποικίλων μηχανισμών [253] [262, 263]: 1) Μείωση της απελευθέρωσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF, Platelet Activating Factor) μέσω καταστολής της βιοσύνθεσης της συνθάσης του PAF στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. 2) Αναστολή της βιοσύνθεσης της θρομβοξανής A₂ (TXA₂, Thromboxane A₂) που δρα ως ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων. 3) Επαγωγή της σύνθεσης NO και της παραγωγής PGI₂ στα ενδοθηλιακά κύτταρα που εμποδίζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 1.9). 4) Επαγωγή της σύνθεσης του NO στα αιμοπετάλια. 5) Μείωση της έκκρισης του παράγοντα vWF από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και της έκτασης του σχηματισμού των ινών του vWF. Μέσω αυτού του μηχανισμού, η HDL εμποδίζει την προσκόλληση των

αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. 6) Μείωση της έκφρασης της E-σελεκτίνης από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενός μορίου προσκόλλησης των αιμοπεταλίων. Μέσω του μηχανισμού αυτού, η HDL μειώνει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι προαναφερόμενοι μηχανισμοί προσδιορίστηκαν σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα ή ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή σε μοντέλα ποντικού με θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια μετά από χορήγηση hHDL ή rHDL-apoA-I (σύμπλοκα haroA-I/φωσφατιδυλοχολίνης).

Τέλος, η HDL μπορεί να δράσει αντιθρομβωτικά μέσω αύξησης της δραστηριότητας της APC (activated protein C) και της πρωτεΐνης S (συμπαράγοντας της APC) του πλάσματος, οι οποίες έχουν αντιπηκτικές ιδιότητες, καθώς και μέσω αναστολής του σχηματισμού της θρομβίνης, μίας πρωτεάσης που διαγείρει το σχηματισμό ινώδους [135] [264-266].

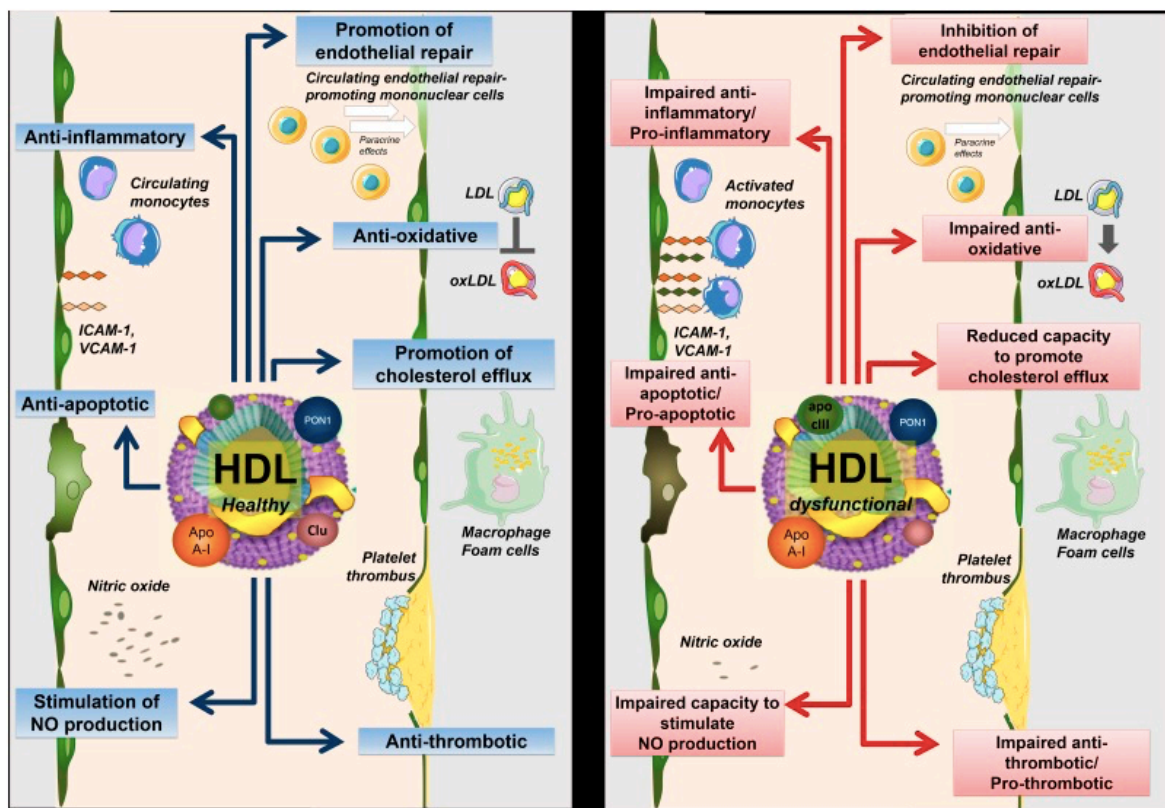
1.4 Η επίδραση της αθηροσκλήρωσης στη λειτουργικότητα της HDL

1.4.1 Μη λειτουργική/δυσλειτουργική HDL σε ασθενείς με CAD

Η HDL που απομονώνεται από ασθενείς με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, όπως η χρόνια CAD και το ACS, χαρακτηρίζεται από απώλεια των αθηροπροστατευτικών λειτουργιών της ενώ μπορεί να αποκτήσει προφλεγμονώδεις ιδιότητες. Ειδικότερα, η δυσλειτουργική HDL των ασθενών αυτών χαρακτηρίζεται από (Εικόνες 1.13 και 1.14): 1) μειωμένη ικανότητα να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και τα υπόλοιπα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, 2) μειωμένη αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη ή αντιθρομβωτική λειτουργία ή ακόμη και προφλεγμονώδη ή προθρομβωτική δράση, 3) μειωμένη ικανότητα να επάγει την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, 4) μειωμένη αντιαποπτωτική δράση ή προαποπτωτική δράση στο ενδοθήλιο, καθώς και 5) μειωμένη ικανότητα να επάγει αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου *in vivo* [50] [103] [267]. Η HDL που απομονώθηκε από το πλάσμα ασθενών με CAD δεν εμπόδισε την οξείδωση της LDL στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [239]. Η ικανότητα της HDL να εμποδίζει την οξείδωση της LDL βρέθηκε, επίσης, μειωμένη σε ασθενείς με ACS [268]. Επιπλέον, η HDL που απομονώθηκε από το πλάσμα ασθενών με σταθερή χρόνια CAD ή ACS εμπόδισε την παραγωγή NO στα HUVEC. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η HDL των ασθενών αυτών να μην εμποδίσει την επαγόμενη από τον TNF- α ενεργοποίηση των HUVEC και να μην επάγει την αποκατάσταση του ενδοθηλίου σε ποντίκια που υπέστησαν τραυματισμό καρωτίδας [164]. Επιπροσθέτως, η HDL των ασθενών με CAD δεν εμπόδισε την επαγόμενη από την oxLDL χημειοταξία των μονοκυττάρων και την έκφραση φλεγμονωδών μορίων προσκόλλησης σε ανθρώπινα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [164] [269, 270]. Τέλος,

η HDL που απομονώθηκε από ασθενείς με CAD και ACS δεν εμπόδισε την απόπτωση στα HAEC, η οποία προκλήθηκε από τον TNF-α ή τη στέρσηση ορού/αυξητικών παραγόντων. Ομοίως, η HDL που απομονώθηκε από τους ασθενείς αυτούς όχι μόνο δεν εμπόδισε την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων της αορτής στα apoE -/- ποντίκια, αλλά ενεργοποίησε το προαποπτωτικό μονοπάτι p38 MAPK/tBid [196].

Εκτός από τη CAD και το ACS, η δυσλειτουργική HDL χαρακτηρίζει σχεδόν όλες τις καρδιαγγειακές νόσους, όπως η καρδιακή ανεπάρκεια [271], η ισχαιμική καρδιομυοπάθεια [272], το εγκεφαλικό επεισόδιο [273], καθώς και νόσους που αυξάνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, όπως ο διαβήτης τύπου II [274] και η οικογενής υπερχοληστερολαιμία [275].



Εικόνα 1.13: Η HDL υγιών ατόμων είναι λειτουργική και εκδηλώνει ποικίλες αθηροπροστατευτικές ιδιότητες στο αρτηριακό τοίχωμα (αριστερά). Η HDL ασθενών με CAD είναι μη λειτουργική/δυσλειτουργική καθώς χάνει τις αθηροπροστατευτικές της λειτουργίες, ενώ μπορεί να μετατραπεί σε σωματίδιο με προφλεγμονώδη, προαποπτωτική και προθρομβωτική δράση (δεξιά) [103].

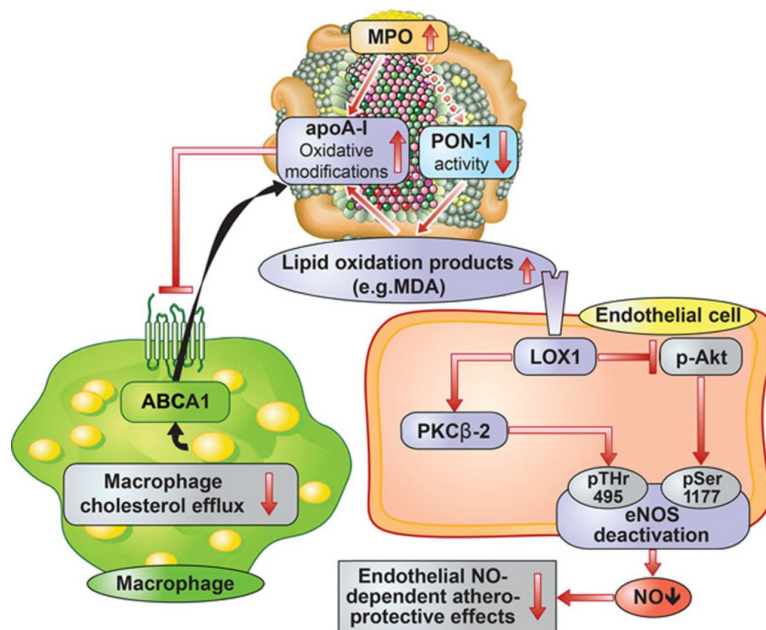
1.4.2 Αλλαγές στην πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στη δυσλειτουργική HDL ασθενών με CAD

Οι λειτουργικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν τη δυσλειτουργία της HDL σε ασθενείς με CAD μπορούν να αποδοθούν σε αλλαγές στη πρωτεϊνική και λιπιδική της σύσταση, όπως αλλαγές στην ποσότητα και στον τύπο των πρωτεϊνών και λιπιδίων που περιέχονται στην HDL, ή σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που περιέχονται στην HDL (Εικόνα 1.14). Σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, όπως η αθηροσκλήρωση, παρατηρείται αλλαγμένη πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση στην HDL που οδηγεί σε μειωμένη λειτουργικότητα ή δυσλειτουργία [50] [276]. Πρωτεωμικές αναλύσεις σε ασθενείς με CAD έδειξαν ότι τα HDL σωματίδια είναι πλούσια σε φλεγμονώδεις πρωτεΐνες οξείας φάσης, όπως το αμυλοειδές Α του ορού (SAA, serum amyloid A) και ο παράγοντας συμπληρώματος C3, ενώ τα επίπεδα της apoA-I και των αντιοξειδωτικών ενζύμων PON1 και PAF-AH είναι μειωμένα. Η ενεργότητα της PON1 είναι, επίσης, μειωμένη στα HDL σωματίδια ασθενών με CAD (Εικόνα 1.14) [50] [81] [277, 278]. Επιπλέον, πρωτεωμική ανάλυση σε ασθενείς με CAD ή ACS έδειξε ότι τα επίπεδα της προφλεγμονώδους apoC-III είναι αυξημένα στα HDL σωματίδια, ενώ μειώνονται τα επίπεδα της αντιαποπρωτικής πρωτεΐνης apoJ (clusterin) [196]. Αναλύσεις λιπιδιωματικής έδειξαν αλλαγές στη σύσταση των λιπιδίων των HDL σωματιδίων που απομονώθηκαν από ασθενείς με CAD, όπως αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και μειωμένα επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων, ενώ τα επίπεδα των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων ήταν αυξημένα (Εικόνα 1.14) [267] [279]. Τα επίπεδα του S1P ήταν, επίσης, μειωμένα στα HDL σωματίδια των ασθενών με CAD τα οποία εμφάνισαν μειωμένη αντιφλεγμονώδη δράση στα VSMCs [185] [267].

Σε συνθήκες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, η apoA-I υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που καταστέλλουν τις αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL, όπως η οξείδωση και η γλυκοζυλίωση (Εικόνα 1.14) [267]. Η μυελοϋπεροξειδάση MPO (myeloperoxidase), η οποία εκρίνεται από μακροφάγα, μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα, επάγει οξειδωτικές τροποποιήσεις σε αμινοξικά κατάλοιπα της apoA-I (Tyr-192, Tyr-18, Tyr-166, Trp-72) στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος (Εικόνα 1.14). Οι τροποποιήσεις αυτές στην apoA-I έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες [280, 281]. In vitro και ex vivo μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη από την MPO οξείδωση της apoA-I οδηγεί στο σχηματισμό HDL σωματιδίων που χαρακτηρίζονται από απώλεια των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων τους [267]. Η οξείδωση των apoA-I και HDL από την MPO μείωσε την ικανότητά τους να επάγουν εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω του ABCA1 (Εικόνα 1.14) [267] [281, 282]. Ομοίως, η έγχυση οξειδωμένης apoA-I από την MPO

σε apoA-I $-/-$ ποντίκια με αθηροσκλήρωση μείωσε σημαντικά την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης *in vivo* [283]. Επιπλέον, η οξειδωτική τροποποίηση της HDL ή της apoA-I που προκλήθηκε από την MPO μετέτρεψε την hHDL σε ένα σύμπλοκο με προφλεγμονώδεις ιδιότητες το οποίο αύξησε την επαγόμενη από τον TNF- α ενεργοποίηση του NF- κ B και την έκφραση του VCAM-1 στα BAEC. Επιπροσθέτως, η επαγόμενη από την MPO οξείδωση της hHDL οδήγησε σε απώλεια της ικανότητάς της να εμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και την επακόλουθη απόπτωση στα HUVEC, καθώς και να ενεργοποιεί την eNOS στα κύτταρα αυτά (Εικόνα 1.14) [284].

In vitro και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η γλυκοζιλίωση των apoA-I και HDL μειώνει την αντιφλεγμονώδη δράση τους. Η γλυκοζιλίωση της HDL μείωσε την ικανότητά της να εμποδίζει την επαγόμενη από την oxLDL προσκόλληση των μονοκυττάρων στα HAEC [285]. Σε συμφωνία με τα *in vitro* ευρήματα, η έγχυση γλυκοζιλιωμένης ελεύθερης λιπιδίων apoA-I ή rHDL σωματιδίων που περιείχαν γλυκοζιλιωμένη apoA-I και φωσφατιδυλοχολίνη σε κουνέλια που κατόπιν υπεστησαν τραυματισμό της καρωτίδας δε μείωσε την έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τη διήθηση των ουδετεροφίλων στον έσω χιτώνα, σε αντίθεση με τη μη γλυκοζιλιωμένη apoA-I σε μορφή ελεύθερης λιπιδίων ή rHDL. Η παρατηρούμενη μείωση της αντιφλεγμονώδους δράσης της γλυκοζιλιωμένης apoA-I αποδόθηκε στη μειωμένη ικανότητά της να εμποδίζει την ενεργοποίηση του NF- κ B και το σχηματισμό ROS [286].



Εικόνα 1.14: Μηχανισμοί που χαρακτηρίζουν τη δυσλειτουργία της HDL σε ασθενείς με CAD: 1) μειωμένη ενεργότητα της PON-1, 2) αυξημένη ενεργότητα της MPO, 3) αυξημένες

οξειδωτικές τροποποιήσεις στην apoA-I και 4) σχηματισμός προϊόντων οξείδωσης λιπιδίων (π.χ. MDA, malondialdehyde). Οι επιφερόμενες αλλαγές στην πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση της HDL οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα και μειωμένη παραγωγή NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα με επακόλουθη μείωση των αθηροπροστατευτικών του δράσεων [50].

1.5 Ο ρόλος της apoE στην αθηροσκλήρωση

1.5.1 Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της apoE: Διαφορές σε δομή και λειτουργία - Συσχέτιση με δυσλιπιδαιμίες και CAD

Η apoE είναι μία πολυμορφική πρωτεΐνη με τρεις πιο συχνά απαντώμενες και περισσότερες από 20 πιο σπάνιες ισομορφές. Οι τρεις πιο συχνά απαντώμενες ισομορφές στον άνθρωπο είναι οι apoE2, apoE3 και apoE4 που κωδικοποιούνται από τρία αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου, ε2, ε3, ε4, αντίστοιχα, και προκύπτουν από πολυμορφισμούς μεμονωμένων νουκλεοτιδίων. Τα εν λόγω αλληλόμορφα εμφανίζουν διαφορετική γονιδιακή συχνότητα στον πληθυσμό με το πιο σπάνιο να είναι το ε2 και το πιο συχνό το ε3 (ε2: 5-10%, ε4: 15-20%, ε3: 65-70%). Επειδή το αλληλόμορφο ε3 εκφράζεται σε υψηλότερη συχνότητα στον πληθυσμό θεωρείται το wt αλληλόμορφο [120] [287, 288]. Από τα αλληλόμορφα ε2, ε3 και ε4 προκύπτουν έξι φαινότυποι με την εξής σειρά κατάταξης από τον πιο συχνό στο λιγότερο συχνό: apoE3/3, apoE3/4, apoE3/2, apoE4/4, apoE4/2 και apoE2/2 [289]. Ο apoE3/3 είναι ο πιο συχνός (50-70% του πληθυσμού) και, κατά συνέπεια, θεωρείται ο «φυσιολογικός» φαινότυπος.

Οι τρεις ισομορφές διαφέρουν μεταξύ τους μόνο λόγω μίας αμινοξικής αντικατάστασης (αλλαγή μίας βάσης στο γονίδιο apoE) στα αμινοξικά κατάλοιπα 112 και 158 της N αμινοτελικής περιοχής: Η apoE2 (η πιο σπάνια μορφή: Cys112, Cys158) και η apoE4 (Arg112, Arg158) διαφέρουν από τη φυσικού τύπου apoE3 (Cys112, Arg158) σε μία Arg158Cys και μία Cys112Arg αντικατάσταση, αντίστοιχα (Εικόνα 1.8). Ωστόσο, η αλλαγή αυτή έχει σημαντικές επιπτώσεις τόσο σε επίπεδο δομής όσο και λειτουργίας [120] [288]. Η apoE2 εμφανίζει πολύ χαμηλότερη (< 2%) συγγένεια σύνδεσης με τον LDLR σε σχέση με τις apoE3 και apoE4 λόγω απουσίας θετικού φορτίου στη θέση 158 της περιοχής πρόσδεσης με τον υποδοχέα, το οποίο απαιτείται για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον LDLR [290]. Αντίθετα, οι ισομορφές apoE3 και apoE4 εμφανίζουν φυσιολογική ικανότητα πρόσδεσης στον LDLR, με την apoE4 να εμφανίζει ελαφρώς μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης [291]. Επιπλέον, διαφέρει η ικανότητα πρόσδεσης των τριών ισομορφών στις λιποπρωτεΐνες, με τις apoE3 και apoE2 να προσδένονται κατά προτίμηση στην HDL και τη apoE4 στην VLDL [292, 293]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινο- και

καρβοξυ-τελικών περιοχών της αροΕ ευθύνονται για τη διαφορά αυτή, καθώς στο καρβοξυ-τελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή δέσμευσης στις/πρόσδεσης με τις λιποπρωτεΐνες [293, 294]. Οι δομικές αυτές αλλαγές έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία των τριών ισομορφών. Συγκριτικά με την αροΕ3, η αροΕ2 σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα αροΒ και χοληστερόλης, καθώς και με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Αντίστοιχα, η αροΕ4 σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αροΒ και χοληστερόλης στο πλάσμα [294].

Μελέτες έχουν συσχετίσει την ισομορφή αροΕ2 με υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III (οικογενής δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία) [288]. Η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (υπερτριγλυκεριδαιμία) και χοληστερόλης στο πλάσμα λόγω μειωμένης ηπατικής κάθαρσης των υπολειμμάτων των χυλομικρών και VLDL, καθώς και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρωσης και πρώιμης CVD [295]. Ο ομόζυγος φαινότυπος αροΕ2/2 έχει συσχετισθεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III. Η συσχέτιση αυτή οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της αροΕ2 στον LDLR, η οποία οδηγεί σε μειωμένο ηπατικό καταβολισμό των υπολειμμάτων των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών [288].

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει το αλληλόμορφο ε4 με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης CAD και CVD, ενώ αντίθετα το αλληλόμορφο ε2 έχει συσχετισθεί με μειωμένο κίνδυνο συγκριτικά με το αλληλόμορφο ε3. Μελέτες έχουν συσχετίσει το γονότυπο αροΕ3/4 και αροΕ4/4 με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης CAD κατά 22% και 42%-45%, αντίστοιχα, συγκριτικά με το γονότυπο αροΕ3/3. Οι φορείς του αλληλομόρφου ε4 εμφάνισαν 46% αυξημένο κίνδυνο για CAD σε σχέση με τους φορείς του ε3, ενώ το αλληλόμορφο ε2 δε συσχετίσθηκε με κίνδυνο εμφάνισης CAD [296-300]. Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι φορείς του αλληλομόρφου ε2 εμφανίζουν ~ 20% μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης CAD συγκριτικά με τα άτομα με γονότυπο αροΕ3/3 [297] [301]. Οι φορείς του αλληλομόρφου ε4 εμφάνισαν, επίσης, αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας από CAD κατά 40% συγκριτικά με τους φορείς του ε2 ή τα άτομα με γονότυπο αροΕ3/3 [289] [300] [302].

Η συσχέτιση της αροΕ4 με CAD οφείλεται στα υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης (TC, total cholesterol) και LDL-C στο πλάσμα των φορέων του αλληλομόρφου ε4 συγκριτικά με τους φορείς των ε2 και ε3 και τα άτομα με γονότυπο αροΕ3/3 [300-304]. Αντίθετα, τα άτομα με γονότυπο αροΕ2/2 εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα LDL-C σε σχέση με το γονότυπο αροΕ3/3 και αροΕ4/4, ενώ οι φορείς του αλληλομόρφου ε2 εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα TC συγκριτικά με το γονότυπο αροΕ3/3 [301] [303]. Οι γονότυποι εμφάνισαν την εξής σειρά κατάταξης με βάση την αύξηση της LDL-C και του κινδύνου εμφάνισης CAD: αροΕ2/2, αροΕ2/3, αροΕ2/4, αροΕ3/3, αροΕ3/4 και αροΕ4/4 [301]. Οι ασθενείς με AMI και CVD που

ήταν φορείς του αλληλομόρφου ε4 εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα LDL-C, TC και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα σε σχέση με τους φορείς των ε2 και ε3 [305, 306].

Η apoE4 έχει, επίσης, συσχετισθεί με υπερτριγλυκεριδαιμία. Άτομα με γονότυπο apoE4/2 και apoE4/3 εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα σε σχέση με το γονότυπο apoE3/3, τα οποία ήταν, ωστόσο, σημαντικά χαμηλότερα συγκριτικά με τον apoE2/2 [303]. Η συσχέτιση της apoE4 με την υπερτριγλυκεριδαιμία μπορεί να αποδοθεί στη μείωση της δραστηριότητας των LPL και HL από την apoE4, η οποία οδηγεί σε επιβράδυνση της λιπόλυσης και κάθαρσης των τριγλυκεριδίων από το πλάσμα [288].

Τέλος, η apoE4 είναι ισχυρός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου Alzheimer (AD), σε αντίθεση με την apoE2 που προστατεύει από την εμφάνιση της νόσου [307, 308]. Η apoE4 είναι παράγοντας κινδύνου και για άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως το Parkinson [309].

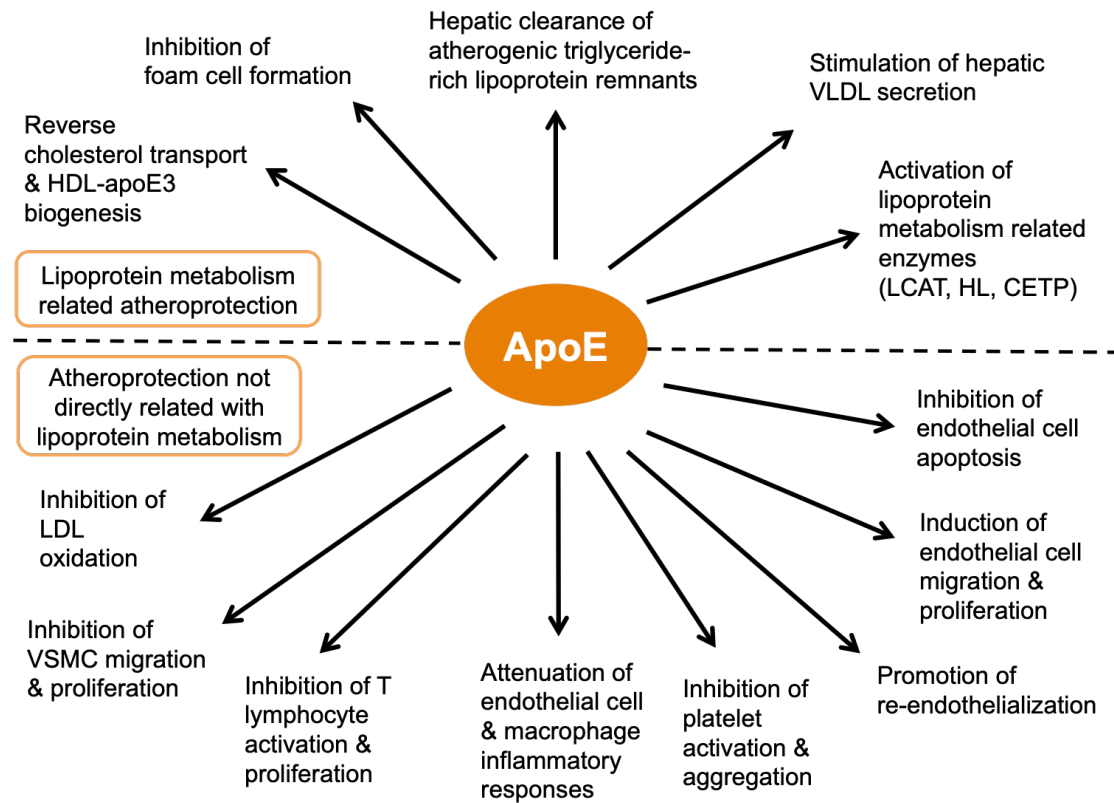
1.5.2 Η apoE προστατεύει από την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης

Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η apoE έχει ποικίλες αθηροπροστατευτικές λειτουργίες μέσω των οποίων καταστέλλει την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (Εικόνα 1.15) [105] [108] [310, 311]. Η ομόζυγη οικογενής έλλειψη του γονιδίου της apoE σε ανθρώπους έχει συσχετισθεί με αθηρογόνο λιποπρωτεϊνικό προφίλ (υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III και υπερχοληστερολαιμία) και διάχυτη αθηροσκληρωτική νόσο [312, 313]. Ποντίκια με πλήρη έλλειψη του γονιδίου της apoE (apoE *-/-*) εμφάνισαν σοβαρή υπερχοληστερολαιμία, ακόμη και όταν τρέφονταν με δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Η εμφανιζόμενη υπερχοληστερολαιμία οφειλόταν σε μεγάλο βαθμό στα αυξημένα επίπεδα VLDL και IDL του πλάσματος λόγω της μειωμένης ηπατικής κάθαρσης των σωματιδίων αυτών. Η συσσώρευση των υπολειμμάτων των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών οδήγησε στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών σε apoE *-/-* ποντίκια υπό δίαιτα χαμηλή σε χοληστερόλη σε ηλικία 10-12 εβδομάδων. Η αθηροσκλήρωση εμφανίστηκε νωρίτερα (σε ηλικία 8-10 εβδομάδων) όταν τα apoE *-/-* ποντίκια τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά [314-317]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αθηροσκλήρωση στα apoE^{-/-} ποντίκια μπορεί να υποχωρήσει, ή ακόμη και να προληφθεί, μέσω αύξησης των επιπέδων της apoE στην κυκλοφορία με τους εξής τρόπους: είτε μέσω αδενομεταφοράς του γονιδίου της apoE στο ήπαρ, είτε με υπερέκφραση του γονιδίου της apoE σε διαγονιδιακό ποντίκι, ή μέσω έγχυσης συνθετικών πεπτιδίων μιμητών της apoE (Ενότητα 1.6.2) [318-320].

Η apoE δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά αγγεία, αλλά τα επίπεδα έκφρασή της είναι υψηλά σε αθηρωματικές πλάκες. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης και ανθρώπους

έδειξαν ότι η apoE πρωτεΐνη συντίθεται κυρίως από τα τοπικά μακροφάγα της αθηρωματικής πλάκας. Ωστόσο, η apoE που παράγεται και εκκρίνεται από το ήπαρ μπορεί να εισβάλει στο αρτηριακό τοίχωμα από την περιφέρεια [321]. Η έκφραση της apoE σε φυσιολογικά επίπεδα από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος μείωσε την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών στις αορτές ποντικών με σοβαρή υπερλιπιδαιμία [322]. Μελέτες σε wt ποντίκια έδειξαν ότι, εκτός από τα μακροφάγα, και τα μονοκύτταρα εκφράζουν apoE. Η έκφραση της apoE τόσο στα μακροφάγα όσο και στα μονοκύτταρα σε apoE h/h x LDLR -/- ποντίκια εμπόδισε την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [323]. Καθώς τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα είναι τα μόνα αιμοποιητικά κύτταρα που εκφράζουν την apoE, η μεταμόσχευση μυελού των οστών σε apoE -/- ποντίκια έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη διερεύνηση του ρόλου της apoE που εκκρίνεται από τα μακροφάγα/μονοκύτταρα στην αθηροσκλήρωση in vivo. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η εκκρινόμενη από τα μακροφάγα apoE έχει αντιαθηρογόνες ιδιότητες που δε σχετίζονται άμεσα με την επίδρασή της στα επίπεδα λιπιδίων του πλάσματος (Ενότητα 1.5.5), και μέσω των ιδιοτήτων αυτών εμποδίζει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [324, 325]. Άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν apoE -/- ποντίκια που υπερεκφράζουν apoE μετά από στοχευμένη αδενομεταφορά του ανθρώπινου γονιδίου της apoE στα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος και επιβεβαίωσαν τον αντιαθηρογόνο ρόλο της apoE η οποία εκφράζεται στο αρτηριακό τοίχωμα. Διαγονιδιακά apoE -/- ποντίκια που εκφράζουν την ανθρώπινη apoE στο αρτηριακό τοίχωμα εμφάνισαν μείωση του μεγέθους των αθηρωματικών πλακών απουσία αλλαγών στη χοληστερόλη του πλάσματος και στο λιποπρωτεϊνικό προφίλ [326]. Επιπλέον, η έκφραση χαμηλών επιπέδων του γονιδίου της apoE μέσω αδενομεταφοράς στο αρτηριακό τοίχωμα των apoE -/- ποντικών οδήγησε σε μειωμένο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα χοληστερόλης πλάσματος [327]. Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν πως η έκφραση της apoE από τα μακροφάγα σε apoE -/- ποντίκια μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών οδηγεί σε ομαλοποίηση των επιπέδων της χοληστερόλης του πλάσματος λόγω αυξημένου ηπατικού καταβολισμού των VLDL σωματιδίων. Η επαγόμενη από την apoE μείωση της υπερχοληστερολαιμίας σε apoE -/- ποντίκια που τρέφονταν με διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη οδήγησε σε σημαντική μείωση της αθηροσκλήρωσης [328, 329].

Συμπερασματικά, τόσο η apoE που βιοσυντίθεται στο ήπαρ όσο και αυτή που παράγεται από τα μακροφάγα/μονοκύτταρα εμποδίζει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης μέσω μείωσης των επιπέδων των λιπιδίων του πλάσματος και του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα.



Εικόνα 1.15: Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της apoE (τροποποιημένη από: [108]).

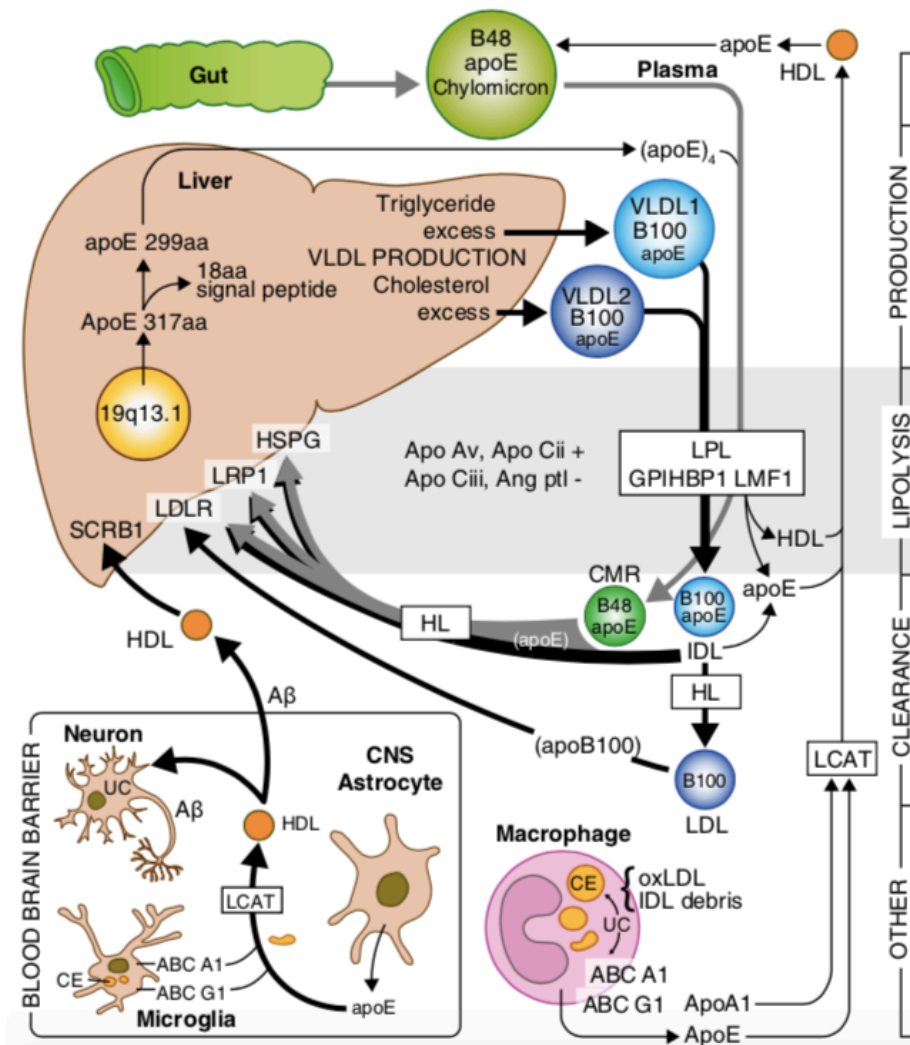
1.5.3 Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της apoE μέσω ρύθμισης του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών

Ο κεντρικός ρόλος της apoE στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών συμβάλλει στην αθηροπροστατευτική της λειτουργία μέσω ποικίλων μηχανισμών. Η apoE μεσολαβεί στην πρόσληψη και κάθαρση των χυλομικρών και VLDL σωματιδίων και των υπολειμμάτων τους μέσω πρόσδεσης με μεγάλη συγγένεια στον υποδοχέα LDLR των παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος. Με τον τρόπο αυτό συμβάλλει στην απομάκρυνση των αθηρογόνων πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών από την κυκλοφορία και στην ομοίωση των λιπιδίων (Εικόνες 1.15, 1.16) [105] [310, 311]. Η apoE2 και πολλοί άλλοι σπάνιοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της apoE που χαρακτηρίζονται από μειωμένη πρόσδεση στον LDLR σχετίζονται με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα λόγω συσσώρευσης των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών και των υπολειμμάτων τους, καθώς και με εμφάνιση υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III σε ανθρώπους (Ενότητα 1.5.1) [288]. Οι πολυμορφισμοί αυτοί έχουν συσχετισθεί με ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε ζωικά μοντέλα και πρόωρης CVD σε ανθρώπους [294] [330]. Επιπλέον, apoE $-/-$ ή apoE $-/-$ x LDLR $-/-$ ποντίκια στα οποία υπερεκφράστηκαν επικρατείς μεταλλάξεις του γονιδίου της ανθρώπινης apoE που χαρακτηρίζονται από μειωμένη πρόσδεση στον LDLR εμφάνισαν

υπερχοληστερολαιμία και υπερτριγλυκεριδαιμία λόγω μειωμένης κάθαρσης των υπολειμμάτων των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Αντίθετα, η υπερέκφραση της ανθρώπινης wt apoE σε apoE -/- ποντίκια επανέφερε τα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος εντός φυσιολογικών ορίων χωρίς να προκληθεί υπερτριγλυκεριδαιμία [331]. Η κάθαρση των υπολειμμάτων των χυλομικρών μεσολαβείται, επίσης, μέσω πρόσδεσης της apoE στον ηπατικό υποδοχέα LRP και στις HSPGs του ήπατος (Εικόνα 1.16) [332, 333].

Η apoE επάγει άμεσα την παραγωγή VLDL και τριγλυκεριδίων από το ήπαρ και συμμετέχει με τον τρόπο αυτό στην ομοιόσταση των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης του πλάσματος (Εικόνες 1.15, 1.16). Μελέτες σε ηπατοκύτταρα apoE -/- ποντικών έδειξαν διαταραγμένη ηπατική έκκριση VLDL τριγλυκεριδίων [334]. Σε αντιστοιχία με τα ευρήματα αυτά, αυξημένη ηπατική παραγωγή VLDL παρατηρήθηκε σε ηπατοκύτταρα με υπερέκφραση της ανθρώπινης apoE (apoE2, apoE3 ή apoE4), καθώς και σε διαγονιδιακά apoE -/- ποντίκια με υπερέκφραση της ανθρώπινης apoE3, τα οποία ανέπτυξαν υπερτριγλυκεριδαιμία [335]. Επιπλέον, η apoE ενεργοποιεί ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, όπως η HL, CETP και LCAT (Εικόνα 1.15). Με τον τρόπο αυτό, η apoE επάγει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της HDL, την ανταλλαγή λιπιδίων μεταξύ VLDL και HDL, καθώς και τη μετατροπή των δισκοειδών σε ώριμα σφαιρικά HDL σωματίδια, αντίστοιχα [336-338].

Τέλος, η apoE επάγει την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης μέσω σχηματισμού HDL σωματιδίων που περιέχουν apoE (HDL-apoE), μέσω της οποίας η περίσσεια χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς επιστρέφει στο ήπαρ για απέκκριση διαμέσου της χολής (Ενότητα 1.5.4) (Εικόνες 1.7, 1.11, 1.16) [113] [294] [339]. Επειδή η apoE είναι συστατικό ορισμένων υποπληθυσμών HDL που απομακρύνουν χοληστερόλη από τα κύτταρα, η συμμετοχή της στην αντίστροφη μεταφορά περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος στο ήπαρ μέσω σχηματισμού HDL-apoE σωματιδίων συμβάλλει στην αθηροπροστατευτική της δράση in vivo, καθώς εμποδίζει το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [126] [340, 341].



Εικόνα 1.16: Ο δομικός και λειτουργικός ρόλος της apoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών: στο μονοπάτι των χυλομικρών, στο μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL σωματιδίων και στο μονοπάτι των HDL σωματιδίων [105].

1.5.4 Η apoE επάγει εκροή χοληστερόλης και αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τα μακροφάγα

Η διαδικασία εκροής χοληστερόλης είναι σημαντική για τη διατήρηση της ομοιόστασης χοληστερόλης στα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος και την πρόληψη του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων και της αθηρογένεσης [342]. Ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ότι η apoE επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα (Εικόνα 1.11). Η ικανότητα των HDL σωματιδίων που απομονώθηκαν από το πλάσμα apoE^{-/-} ποντίκων να επάγουν εκροή χοληστερόλης από περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού ήταν μειωμένη σε σύγκριση με τα HDL σωματίδια από wt ποντίκια. Η προσθήκη εξωγενούς apoE στα HDL σωματίδια που δεν περιείχαν apoE επανέφερε στα φυσιολογικά επίπεδα την ικανότητα εκροής χοληστερόλης. Η ίδια μελέτη πρότεινε ότι η apoE που περιέχεται στα HDL σωματίδια του

πλάσματος, και όχι αυτή που παράγεται ενδογενώς από τα μακροφάγα, είναι υπεύθυνη για την επαγωγή εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα [340]. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η εκκρινόμενη apoE από τα μακροφάγα του έσω χιτώνα διευκολύνει την εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [126, 127] [343]. Ειδικότερα, μία μελέτη συνέκρινε την ικανότητα του πλάσματος να επάγει εκροή χοληστερόλης ανάμεσα σε apoE -/- ποντίκια και διαγονιδιακά apoE -/- ποντίκια ομόζυγα για την έκφραση του ανθρώπινου αλληλομόρφου ε3 στα μακροφάγα. Η έκφραση της ανθρώπινης apoE3 από τα μακροφάγα, έστω και σε χαμηλά επίπεδα, αύξησε την ικανότητα του πλάσματος των apoE -/- ποντικών να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα in vitro μέσω σχηματισμού HDL-apoE σωματιδίων (γ-LpE, δισκοειδή preβ1-LpE και ώριμα σφαιρικά α-LpE σωματίδια) στο πλάσμα. Τα σωματίδια αυτά απομάκρυναν αποτελεσματικά την περίσσεια χοληστερόλης από τα μακροφάγα in vitro [126]. Επιπλέον, η έκκριση της ανθρώπινης apoE3 από τα μακροφάγα στα apoE -/- ποντίκια οδήγησε: 1) στην πρόσδεση της εκκρινόμενης apoE3 στα ώριμα α-HDL σωματίδια και έτσι αυξήθηκε η ικανότητα των σωματιδίων αυτών να προσλαμβάνουν χοληστερόλη συγκριτικά με τα α-HDL σωματίδια που δεν περιείχαν apoE3, 2) στην αύξηση της ικανότητας του πλάσματος να εστεροποιεί τη χοληστερόλη που προέρχεται από τα κύτταρα, καθώς η apoE δρα ως ενεργοποιητής της LCAT [126]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η έκφραση της ανθρώπινης apoE στα μακροφάγα διαγονιδιακών apoE-/- ποντικών αύξησε την εκροή χοληστερόλης από τα περιτοναϊκά μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος με αποτέλεσμα τη μείωση του σχηματισμού των αφρωδών κυττάρων. Οι μηχανισμοί αυτοί οδήγησαν σε σημαντική μείωση της αθηροσκλήρωσης στην αορτή των apoE-/- ποντικών [127]. Επιπροσθέτως, η ενδογενής έκφραση ανθρώπινης apoE από τα μακροφάγα in vitro και η επώαση των κυττάρων αυτών με εξωγενούς προέλευσης apoE φτωχής σε λιπίδια οδήγησαν σε επαγωγή της εκροής χοληστερόλης στα HDL3 (α-HDL) σωματίδια [341] [343, 344]. Η εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα έλαβε χώρα σε μεγαλύτερο βαθμό όταν η apoE είχε ενδογενή προέλευση [343]. Η apoE επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω των μονοπατιών ABCA1 και ABCG1. Η ανθρώπινη apoE αλληλεπιδρά με τον ABCA1 και επάγει εκροή της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα [109]. Η φτωχή σε λιπίδια apoE που εκκρίνεται από τα μακροφάγα προσδένεται στον ABCA1 και επάγει την εκροή της περίσσειας ελεύθερης χοληστερόλης από τα κύτταρα αυτά (Εικόνα 1.11) [142]. Τα HDL-apoE σωματίδια, επίσης, επάγουν εκροή της ελεύθερης χοληστερόλης από τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης με τον ABCG1, η οποία μετατρέπεται σε εστέρες χοληστερόλης από την LCAT (Εικόνα 1.11) [112]. Τα HDL-apoE σωματίδια μέσω αλληλεπίδρασης με τους

ηπατικούς υποδοχείς SR-BI και LDLR μεταφέρουν τη χοληστερόλη στο ήπαρ (Εικόνα 1.7B). Μέσω αυτών των μηχανισμών η apoE επάγει την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τα μακροφάγα στο ήπαρ [113] [142] [339].

In vitro και in vivo μελέτες έδειξαν ότι η apoE μπορεί να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα δρώντας σε συνεργασία με την apoA-I. Η έκθεση πρωτογενών μακροφάγων wt ποντίκου ή ανθρώπου, τα οποία εμπλουτίστηκαν με χοληστερόλη, σε φτωχή σε λιπίδια ή σε ελεύθερη λιπιδίων apoA-I οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή apoE και εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα αυτά [345]. Επιπλέον, μελέτες σε apoE -/- και apoE-/- x apoA-I -/- ποντίκια που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση μυελού των οστών από wt ποντίκι, ο οποίος αποτελεί πηγή μακροφάγων που εκφράζουν apoE, έδειξαν ότι η apoA-I εισέρχεται στις αορτικές αθηρωματικές πλάκες και σε συνεργασία με την apoE που παράγεται ενδογενώς από τα τοπικά μακροφάγα επάγουν εκροή χοληστερόλης. Μέσω των μηχανισμών αυτών, η apoE σε συνεργασία με την apoA-I μείωσαν το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας στην αορτή των ποντικών αυτών [346].

Οι διαφορετικές ανθρώπινες ισομορφές της apoE (apoE2, apoE3 και apoE4) διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να επάγουν εκροή χοληστερόλης από τα ανθρώπινα μακροφάγα που απομονώθηκαν από άτομα ομόζυγα για την εκάστοτε ισομορφή. Για παράδειγμα, μικρότερη συσσώρευση χοληστερόλης παρατηρήθηκε στα μακροφάγα με γονότυπο apoE3/3, αναδεικνύοντας την apoE3 ως την ισομορφή με τη μεγαλύτερη ικανότητα εκροής χοληστερόλης [347].

Συμπερασματικά, η apoE που παράγεται από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος επάγει την εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα αυτά μειώνοντας, έτσι, τη συσσώρευση της χοληστερόλης και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων στις αθηρωματικές πλάκες.

1.5.5 Αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της apoE που δε σχετίζονται άμεσα με την επίδρασή της στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μειωμένη έκφραση της apoE στο αρτηριακό τοίχωμα επάγει αθηροσκλήρωση σε ποντίκια, ενώ η έκφραση της apoE (ανθρώπου ή ποντικού) στο αρτηριακό τοίχωμα apoE -/- ποντικών σε χαμηλά επίπεδα μειώνει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα χοληστερόλης ή το λιποπρωτεϊνικό προφίλ του πλάσματος [314-316] [326, 327] [348]. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την ικανότητα της apoE να καταστέλλει την αθηροσκλήρωση μέσω μηχανισμών που δε σχετίζονται άμεσα με τη ρύθμιση των επιπέδων των λιπιδίων στο πλάσμα και στα κύτταρα. Νεότερες μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ενός επιπλέον αντιαθηρογόνου ρόλου της apoE που δε σχετίζεται άμεσα με τη δράση της στο μεταβολισμό και τη μεταφορά της

χοληστερόλης (Εικόνα 1.15). Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της apoE σε διαγονιδιακά apoE^{-/-} x apoA-I^{-/-} ποντίκια μείωσαν σημαντικά τις αορτικές αθηρωματικές πλάκες μέσω ενός μηχανισμού που δεν εξαρτάται από την παρουσία της apoA-I ή της HDL ή την επαγωγή εκροής χοληστερόλης [349]. Επιπροσθέτως, τα χαμηλά επίπεδα εξωηπατικής και μη εκκρινόμενης από τα μακροφάγα apoE εμπόδισαν την αθηροσκλήρωση σε διαγονιδιακά apoE^{-/-} ποντίκια, χωρίς να επηρεάζουν τα επίπεδα των υπολειμμάτων των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα και να μειώνουν την υπερχοληστερολαιμία [350]. Οι αθηροπροστατευτικές δράσεις της apoE που δεν εμπλέκονται άμεσα στο μεταβολισμό και τη μεταφορά λιπιδίων περιγράφονται στις Ενότητες 1.5.5.1-1.5.5.4.

1.5.5.1 Οι αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της apoE

1.5.5.1.1 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Η apoE εμποδίζει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την προσκόλληση των μονοκυττάρων σε αυτά. Η apoE εμπόδισε την ενεργοποίηση των HUVEC μειώνοντας την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση του VCAM1. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα apoER2 μετά την πρόσδεση της apoE, η οποία οδήγησε σε ενεργοποίηση της eNOS μέσω της PI3K κινάσης και σε επακόλουθη επαγωγή της παραγωγής NO [351, 352]. Σε αντιστοιχία με τα ευρήματα αυτά, η πρόσδεση της apoE3 στον apoER2 των BAEC μείωσε την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα κύτταρα αυτά [353]. Σε συμφωνία με τα in vitro ευρήματα, η apoE μείωσε την έκφραση των ICAM-1, PECAM-1 (Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) και JAM-A (Junctional Adhesion Molecule 2) στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αορτικού τόξου σε υπερλιπιδαιμικά apoE h/h x LDLR^(-/-) ποντίκια [354].

1.5.5.1.2 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα μονοκύτταρα και μακροφάγα

Η apoE εμποδίζει, επίσης, την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και μακροφάγων. Η έκφραση της apoE στα περιτοναϊκά μακροφάγα και μονοκύτταρα που απομονώθηκαν από apoE^{-/-} ποντίκια μείωσε την επαγόμενη από το LPS έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα κύτταρα αυτά. Ο μηχανισμός δράσης της apoE περιλάμβανε την αύξηση των επιπέδων του miR-146a στα περιτοναϊκά μακροφάγα και μονοκύτταρα, η οποία οδήγησε σε μείωση της επαγόμενης από το LPS ενεργοποίησης του NF-κB μονοπατιού στα κύτταρα αυτά [323]. Σε συμφωνία με τα in vitro ευρήματα, η έκφραση της apoE, ακόμη και σε μικρό βαθμό, στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα σε apoE h/h x LDLR^(-/-) ποντίκια εμπόδισε την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών μέσω αύξησης των επιπέδων του miR-146a, η οποία

οδήγησε σε καταστολή του NF-κB μονοπατιού [323]. Η αντιφλεγμονώδης αυτή δράση της apoE οδήγησε στη μείωση του σχηματισμού αορτικών αθηρωματικών πλακών στα apoE h/h x LDLR -/- ποντίκια, ενώ δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των λιπιδίων στο πλάσμα [323]. Επιπλέον, η έκφραση της apoE στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα σε apoE h/h x LDLR -/- ποντίκια κατέστειλε την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων της κυκλοφορίας μέσω μείωσης της έκφρασης των προφλεγμονώδων επιφανειακών μορίων ICAM-1, ITGA-4 (integrin subunit alpha 4) και L-σελεκτίνη. Ο μηχανισμός δράσης της apoE περιλάμβανε την αύξηση των επιπέδων των πλούσιων σε apoA-I HDL σωματιδίων στο πλάσμα. Η αύξηση αυτή οδήγησε σε επαγωγή της εκροής χοληστερόλης από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και σε επακόλουθη μείωση της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης λιπιδίων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών [354]. Επιπλέον, η apoE μείωσε τον αριθμό των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων και αορτικών μακροφάγων στα apoE h/h x LDLR -/- ποντίκια, ενώ οδήγησε σε μειωμένη συσσώρευση των μονοκυττάρων και μακροφάγων στις αθηρωματικές πλάκες στα apoE h/h x apoE -/- και apoE h/h x LDLR -/- ποντίκια, αντίστοιχα [323] [354, 355]. Σε αντιστοιχία με τα ευρήματα αυτά, η ελεύθερη λιπιδίων apoE και τα HDL-apoE σωματίδια μέσω αύξησης των επιπέδων του miR-145 στα πρωτογενή VSMCs ποντικού οδήγησαν σε μειωμένη προσέλκυση των μακροφάγων στο αρτηριακό τοίχωμα, και με τον τρόπο αυτό μείωσαν την αθηροσκλήρωση σε apoE -/- ποντίκια [356].

Η apoE επάγει έναν αντιφλεγμονώδη φαινότυπο στα μακροφάγα. Η apoE μέσω πρόσδεσης στους επιφανειακούς υποδοχείς VLDLR ή ApoER2 (Apolipoprotein E Receptor 2) των μακροφάγων ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στη μείωση της έκφρασης δεικτών των μακροφάγων τύπου M1 (π.χ. iNOS), ενώ αυξάνει την έκφραση δεικτών τύπου M2 (π.χ. αργινάση-1) [357]. Τα μακροφάγα τύπου M1 συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας, ενώ τα μακροφάγα τύπου M2 συμμετέχουν στην υποχώρηση της αθηροσκλήρωσης και στη μείωση της φλεγμονής [358-360]. Μέσω αυτής της δράσης, η apoE μειώνει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ενώ επάγει την έκκριση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στα μακροφάγα [357] [361]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η έκφραση της apoE στα μακροφάγα ρυθμίζεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Ο TNF-α αυξάνει την έκφραση της apoE στα κύτταρα αυτά, ενώ αυτή μειώνεται από την IFN-γ (Interferon gamma) [362, 363].

1.5.5.1.3 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα T κύτταρα

Η apoE καταστείλλει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων. Η apoE εμπόδισε την εξαρτώμενη από αντιγόνα ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω μείωσης της επαγόμενης από την IFN-γ έκφρασης των μορίων του μείζονος συμπλέγματος

ιστοσυμβατότητας (MHC, major histocompatibility complex) τάξης II και των επιφανειακών πρωτεϊνών CD40 και CD80 στα μακροφάγα, τα οποία δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [364]. Επιπλέον, τα σωματίδια HDL-C που περιείχαν apoE (apoE-HDL-C), τα οποία απομονώθηκαν από πλάσμα σκύλου που τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη, κατέστειλαν την επαγόμενη από φυτο-αιμοσυγκολλητίνη (PHA, phytohemagglutinin) ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων [365]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η apoE καταστέλλει, επίσης, τον πολλαπλασιασμό των CD4 βοηθητικών και CD8 κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων που επάγεται από διέγερση με μιτογόνα [366-368] [369, 370]. Η δράση αυτή της apoE αποδόθηκε στη μείωση της παραγωγής και έκκρισης της βιοενεργής IL-2 από τα διεγερμένα με μιτογόνα T λεμφοκύτταρα, καθώς και της ενεργότητάς της στα κύτταρα αυτά [367]. Οι μηχανισμοί αυτοί εμπόδισαν τη G1A/G1B μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στα T λεμφοκύτταρα και την είσοδο στη G1B φάση [370]. Επιπλέον, τα apoE-HDL-C σωματίδια εμπόδισαν την επαγόμενη από PHA σύνθεση DNA και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων μέσω καταστολής της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} [365].

1.5.5.1.4 Μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης της apoE στα VSMCs

Η apoE εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των VSMCs που επάγεται από τον ορό, την oxLDL και τον PDGF (platelet derived growth factor) [371-375]. Η ανθρώπινη apoE3 κατέστειλε την επαγόμενη από τον ορό είσοδο των πρωτογενών αορτικών VSMCs ποντικού ή ανθρώπου στην S φάση του κυτταρικού κύκλου και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής της έκφρασης της COX2. Η αύξηση αυτή οδήγησε σε αυξημένη σύνθεση PGI2 στα κύτταρα αυτά και σε ενεργοποίηση του υποδοχέα της PTGIR με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης της κυκλίνης A. Σε συμφωνία με τα *in vitro* ευρήματα, η υπερέκφραση της apoE σε apoE ^{-/-} ποντίκια αύξησε την έκφραση της COX2 στην αορτή [374]. Ομοίως, η ανθρώπινη ελεύθερη λιπιδίων apoE και τα preβ-HDL σωματίδια που περιείχαν apoE τα οποία απομονώθηκαν από πλάσμα wt ποντικού (preβ-HDL-apoE) εμπόδισαν τον επαγόμενο από τον ορό πολλαπλασιασμό των πρωτογενών VSMCs ποντικού μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού COX2/PGI2/PTGIR (Prostaglandin I2 (Prostacyclin) Receptor). Η ενεργοποίηση αυτή μείωσε την έκφραση του miR221/222, το αποτελεί μετα-μεταφραστικό ρυθμιστή του p27 (Kip1, Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), και οδήγησε σε επακόλουθη αύξηση της έκφρασης του p27 στα VSMCs. Οι μηχανισμοί αυτοί οδήγησαν σε αναστολή της μετάβασης των VSMCs στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ηπατική υπερέκφραση της ανθρώπινης apoE σε apoE ^{-/-} ποντίκια οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του miR221/222 στην αορτή, επιβεβαιώνοντας τη ρύθμιση του

miR221/222 από την apoE in vivo [372]. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της ανθρώπινης apoE με τους HSPGs ανέστειλε τον επαγόμενο από τον PDGF πολλαπλασιασμό των πρωτογενών αορτικών VSMCs ποντικού ή αρουραίου μέσω ενεργοποίησης της iNOS [371] [373]. Η ανθρώπινη apoE εμπόδισε, επίσης, την επαγόμενη από τον PDGF μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την πρόσδεση της apoE στον LRP-1 και την ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από το cAMP πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA, cAMP-dependent protein kinase A) [371] [373] [375, 376].

1.5.5.2 Η επίδραση της apoE σε λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων και στην αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό

Μελέτες έχουν δείξει ότι η επίδραση της apoE3 στις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων συμβάλλει στον αθηροπροστατευτικό της ρόλο. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές είναι περιορισμένες και οι μηχανισμοί δράσης της apoE3 δεν έχουν προσδιοριστεί πλήρως. Η ανθρώπινη apoE3 επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό στα BAEC και HRMEC (Human Retinal Microvascular Endothelial Cells), αντίστοιχα [353] [377]. Σε συμφωνία με τα in vitro ευρήματα, η έκφραση της ανθρώπινης apoE3 μέσω αναδενομεταφοράς σε ποντίκια στα οποία προκλήθηκε τραυματισμός της καρωτίδας οδήγησε σε αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου στο αρτηριακό τοίχωμα [353]. Επιπλέον, η ανθρώπινη apoE3 μείωσε την επαγόμενη από στερηση ορού απόπτωση στα HUVEC [378]. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δράσης της apoE3 θα συζητηθούν στο Κεφάλαιο Συζήτηση-Συμπεράσματα.

1.5.5.3 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της apoE

Η apoE έχει αντιοξειδωτική δράση. Η apoE εμποδίζει την οξείδωση των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών in vitro και in vivo [379] και, κατά επέκταση, θα μπορούσε να αναστέλλει τη συσσώρευση της oxLDL στο αρτηριακό τοίχωμα in vivo [108]. Όντως, αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες έχουν βρεθεί σε apoE -/- ποντίκια και έχει παρατηρηθεί οξείδωση της LDL σε συγκεκριμένους ειδικούς επιτόπους στις αορτικές αθηρωματικές τους πλάκες [380]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, οι λιποπρωτεΐνες της κυκλοφορίας που απομονώθηκαν από apoE-/- ποντίκια ήταν περισσότερο οξειδωμένες και πιο επιρρεπείς στην οξείδωση in vitro σε σχέση με αυτές που προήλθαν wt ποντίκια [340]. Αν και ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της apoE δεν είναι πλήρως κατανοητός, έχει βρεθεί ότι η apoE μπορεί να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα (κυρίως Cu²⁺ και Fe²⁺) και με τον τρόπο αυτό, πιθανώς, να τα απομονώνει και να αποτρέπει τη συμμετοχή τους σε διαδικασίες οξείδωσης [379]. Η αντιοξειδωτική δράση της apoE θα μπορούσε, ίσως, να προστατεύει από τη χημειοταξία των μονοκυττάρων και το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων στον

υποενδοθηλιακό χώρο, διαδικασίες που επάγονται από την oxLDL [108].

1.5.5.4 Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της apoE

Μελέτες έχουν δείξει ότι η apoE έχει αντιθρομβωτική δράση *in vitro* μέσω της οποίας θα μπορούσε να εμποδίζει το σχηματισμό θρόμβου στις αθηρωματικές πλάκες *in vivo*. Τα HDL σωματίδια πλούσια σε apoE που απομονώθηκαν από την HDL του πλάσματος υγιούς ανθρώπου (HDL-apoE) εμπόδισαν τη συσσώρευση των πρωτογενών ανθρώπινων αιμοπεταλίων που προκλήθηκε από το ADP ή την επινεφρίνη ή το κολλαγόνο ή τη θρομβίνη [381, 382]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, τα rHDL-apoE σωματίδια (σύμπλοκα ανθρώπινης apoE/φωσφατυδιλοχολίνης) εμπόδισαν τη συσσώρευση των πρωτογενών ανθρώπινων αιμοπεταλίων που προκλήθηκε από το ADP, την επινεφρίνη ή το κολλαγόνο [383, 384]. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός περιλάμβανε την πρόσδεση της apoE στον επιφανειακό υποδοχέα των ανθρώπινων αιμοπεταλίων apoER2 [384], η οποία οδήγησε στην ενεργοποίηση της συνθετάσης του NO και στην επακόλουθη παραγωγή NO [383]. Το παραγόμενο NO ενεργοποίησε τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του cGMP (Cyclic guanosine monophosphate) στα αιμοπετάλια [383]. Σε αντιστοιχία με τα ευρήματα αυτά, τα rHDL-apoE σωματίδια εμπόδισαν την επαγόμενη από κολλαγόνο ή θρομβίνη συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων. Ωστόσο, η αντιθρομβωτική δράση των rHDL-apoE σωματιδίων αποδόθηκε στη δέσμευση της χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων και στην ικανότητά τους να απομακρύνουν χοληστερόλη από αυτή [382].

1.6 Η HDL και η apoE αποτελούν θεραπευτικούς στόχους για την αθηροσκλήρωση

1.6.1 Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της ASCAD που στοχεύουν το μεταβολισμό και τη λειτουργικότητα της HDL

1.6.1.1 Θεραπευτικές προσεγγίσεις αύξησης της HDL-C έναντι της ASCAD: μηχανισμοί θεραπευτικής δράσης και αποτελεσματικότητα σε μείωση καρδιαγγειακού κινδύνου

Ο καρδιαγγειακός κίνδυνος παραμένει σε υψηλού κινδύνου ασθενείς με ASCAD που λαμβάνουν υπολιπιδαιμική φαρμακευτική αγωγή, παρά τη σημαντική μείωση της LDL-C του πλάσματος (Ενότητα 1.1.5) [40] [42]. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της HDL-C του πλάσματος και της πρώιμης εμφάνισης ASCAD, όπως προέκυψε από πολλές επιδημιολογικές μελέτες, σε συνδυασμό με την πληθώρα των αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων της HDL (Ενότητα 1.3.2) (Εικόνα 1.9) οδήγησε στην υπόθεση ότι η αύξηση των επιπέδων της HDL-C θα μπορούσε να οδηγήσει στη θεραπεία

της ASCAD (“HDL hypothesis”) [49]. Έτσι, η αύξηση των επιπέδων της HDL-C αποτέλεσε τον πρωταρχικό φαρμακολογικό στόχο για τη θεραπεία της ASCAD, καθώς και για την πρόληψη και μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Πολλές θεραπευτικές προσεγγίσεις αναπτύχθηκαν για την αύξηση της HDL-C και αξιολογήθηκαν σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο [48] [50] [139].

Τα ήδη διαθέσιμα υπολιπιδαιμικά φάρμακα στατίνες, φιμπράτες και νιασίνη αυξάνουν τα επίπεδα HDL-C κατά 2-10%, 5-15% 15-30%, αντίστοιχα [385]. Ωστόσο, η αύξηση αυτή δε συσχετίστηκε με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε κλινικές δοκιμές [386]. Για παράδειγμα, οι στατίνες μείωσαν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε ασθενείς με CAD κατά 14%, ωστόσο η μείωση αυτή αποδόθηκε στην επαγόμενη μείωση της LDL-C και ήταν ανεξάρτητη της επίδρασης στα επίπεδα της HDL-C [387]. Επιπλέον, η χορήγηση φιμπρατών ή νιασίνης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II ή ASCAD, αντίστοιχα, οι οποίοι λάμβαναν στατίνες, δεν οδήγησε σε περαιτέρω μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου, παρά την αύξηση στα επίπεδα της HDL-C [388, 389].

Οι νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που αναπτύχθηκαν για την αύξηση των επιπέδων της HDL-C στοχεύουν διαφορετικά στάδια του μεταβολικού μονοπατιού της HDL. Ειδικότερα, αυτές στοχεύουν σημαντικά μόρια του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης, όπως apoA-I, ABCA1, ABCG1, LCAT, CEPT και EL (Ενότητα 1.3.2.1) (Εικόνα 1.10). Οι πιο αντιπροσωπευτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων HDL-C στο πλάσμα είναι (Εικόνα 1.17) [48] [143] [390]: 1) Οι επαγωγείς της ενδογενούς σύνθεσης της apoA-I (RVX-208) που στοχεύουν τη βιογένεση της HDL. Η ενδογενής παραγωγή της apoA-I επάγεται σε μεταγραφικό επίπεδο, καθώς ο RVX-208 εμποδίζει τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες BET (bromodomain and extra-terminal domain) της μεταγραφής του apoA-I γονιδίου. 2) Οι συνθετικοί αγωνιστές των LXRs (Liver X Receptors) (LXRα/β αγωνιστές: LXR-623, T0901317, GW3965, GW6340, AZ876, ATI-III) που στοχεύουν τη βιογένεση της HDL καθώς επάγουν τη μεταγραφή των ABCA1 και ABCG1 μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων LXRα/β. 3) Οι συνθετικοί αγωνιστές των PPARs (PPAR-α αγωνιστής: K-877, PPAR-α/δ αγωνιστής: GFT505) που ενεργοποιούν το μονοπάτι PPAR-α ή/και PPAR-δ, το οποίο επάγει τη μεταγραφή και την ηπατική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη βιογένεση, ωρίμανση και αναδιαμόρφωση της HDL (όπως, apoA-I, ABCA1, LCAT, PLTP). 4) Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη LCAT (rLCAT: ACP-501, ETC-642) που στοχεύει την ωρίμανση της HDL καθώς επάγει την ενεργότητα του ενζύμου LCAT του πλάσματος. 5) Οι αναστολείς της CEPT (torcetrapib, dalcetrapib, anacetrapib, evacetrapib,

TA-8995) που απενεργοποιούν το ένζυμο CEPT το οποίο συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της HDL, καθώς επάγει τη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL στις αροΒ-λιποπρωτεΐνες (κυρίως VLDL και LDL) σε ανταλλαγή με τριγλυκερίδια. 6) Οι αναστολές της EL που απενεργοποιούν το ένζυμο EL το οποίο συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της HDL και επάγει τον καταβολισμό της apoA-I και HDL [64] [391, 392].

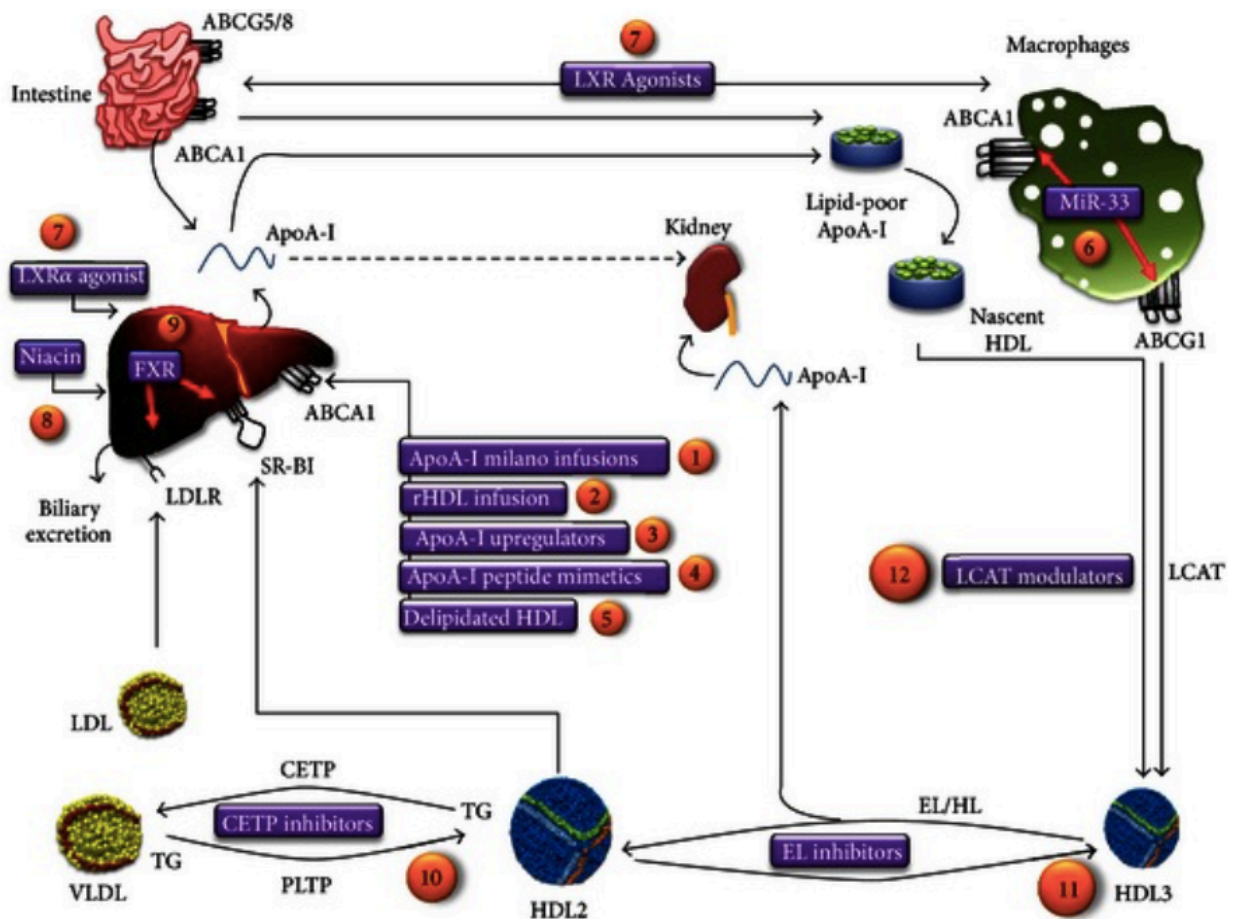
Προκλινικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης έδειξαν ότι οι περισσότερες από τις παραπάνω θεραπευτικές στρατηγικές επάγουν την αύξηση των επιπέδων HDL-C στο πλάσμα και την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα, μειώνουν ή εμποδίζουν το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας και εμποδίζουν ή αναστρέφουν την αθηροσκλήρωση [48] [139] [390]. Ωστόσο, κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι οι θεραπευτικές αυτές προσεγγίσεις δε μειώνουν σημαντικά τον καρδιαγγειακό κίνδυνο και δεν οδηγούν σε υποχώρηση της αθηρωματικής πλάκας (μείωση του όγκου του αθηρώματος) σε ασθενείς με CAD ή CVD, παρά την επιφερόμενη αύξηση της HDL-C στο πλάσμα και της εκροής χοληστερόλης που μεσολαβείται από τον ABCA1 [48] [51] [390]. Επιπροσθέτως, κάποιες από τις θεραπευτικές αυτές στρατηγικές προκάλεσαν παρενέργειες (π.χ. υπερτριγλυκεριδαιμία και ηπατική στεάτωση), με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον αναστολέα CEPT πρώτης γενιάς torcetrapib. Σε μία κλινική δοκιμή φάσης III, ο αναστολέας αυτός αύξησε τον κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων, τη νοσηρότητα και θνησιμότητα σε ασθενείς με CVD, παρά την επιφερόμενη αύξηση της HDL-C στο πλάσμα (κατά 72.1%). Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν σε διακοπή της περαιτέρω κλινικής αξιολογήσης του torcetrapib [393].

Σε συμφωνία με τα ευρήματα των κλινικών μελετών, μελέτες μεντελικής τυχαιοποίησης (Mendelian randomization studies) έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί ή μεταλλάξεις σε σημαντικά γονίδια του μεταβολισμού της HDL (όπως, apoA-I, ABCA1, SR-BI, EL, CEPT) που οδηγούν σε αύξηση ή μείωση της HDL-C στο πλάσμα δε σχετίζονται με μειωμένο ή αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, αντίστοιχα [394-396]. Αντίστοιχα, σε ασθενείς με CAD έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα HDL-C στο πλάσμα [270]. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με την αποτυχία των θεραπευτικών προσεγγίσεων που αυξάνουν την HDL-C να μειώσουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα οδηγούν στα εξής συμπεράσματα [139] [143] [397]: 1) Τα επίπεδα HDL-C στο πλάσμα δεν αντικατοπτρίζουν την ικανότητα της HDL να προστατεύει από αθηροσκλήρωση και τη λειτουργικότητά της. Η αύξηση της HDL-C στο πλάσμα, αυτή καθε αυτή, δεν επαρκεί για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου και της θνησιμότητας σε άτομα με CAD. 2) Τα επίπεδα HDL-C στο πλάσμα αποτελούν ένα βιοδείκτη που υποδεικνύει τον κίνδυνο για ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και δεν πρέπει να

αποτελούν τον πρωταρχικό φαρμακολογικό στόχο των θεραπευτικών προσεγγίσεων. 3) Οι φαρμακολογικές παρεμβάσεις στην εγγενή πολυπλοκότητα του μεταβολικού μονοπατιού της HDL μπορεί να επιφέρουν επιβλαβείς παρενέργειες εν μέρει λόγω της ποικίλης ετερογένειας των HDL υποπληθυσμών (μέγεθος, σχήμα, πρωτεϊνική-λιπιδική σύσταση, αναλογία πρωτεϊνών-λιπιδίων), η οποία καθορίζει τις πολλαπλές λειτουργίες της απολιποπρωτεΐνης αυτής.

1.6.1.2 Η λειτουργικότητα της HDL ως πρωταρχικός θεραπευτικός στόχος για την ASCAD έναντι των επιπέδων HDL-C

Η αποτυχία των θεραπευτικών προσεγγίσεων που αυξάνουν τα επίπεδα HDL-C στο πλάσμα να μειώσουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε κλινικές μελέτες σε συνδυασμό με τα ευρήματα από τις μελέτες μεντελικής τυχαιοποίησης υποδεικνύουν ότι η βελτίωση της λειτουργικότητας της HDL είναι καταλληλότερος θεραπευτικός στόχος για την ASCAD σε σχέση με τη μεμονωμένη αύξηση της HDL-C στο πλάσμα. Η ερευνητική κοινότητα έχει πλέον εστιαστεί στην ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών που ενισχύουν τη λειτουργικότητα της HDL, αντί να αυξάνουν τα επίπεδα HDL-C στο πλάσμα [50] [398]. Ο σχεδιασμός θεραπευτικών στρατηγικών που απλά θα οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων HDL-C χωρίς να βελτιώνουν τη λειτουργικότητα της HDL ενδεχομένως να έχει σε επίπεδο κλινικών μελετών την αποτυχημένη κατάληξη των αναστολέων CEPT torcetrapib και dalcetrapid [397]. Η λειτουργικότητα της HDL εξαρτάται από την πρωτεϊνική και λιπιδική της σύσταση, η οποία καθορίζει, εκτός από το μέγεθος και το σχήμα των HDL σωματιδίων, τις ποικίλες αθηροπροστατευτικές της λειτουργίες. Η apoA-I, το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL, παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές από τις αθηροπροστατευτικές της λειτουργίες (Ενότητα 1.3.2). Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί ώστε να μιμούνται τη λειτουργία της apoA-I ή/και να βελτιώνουν τη λειτουργικότητα της HDL περιλαμβάνουν (Εικόνα 1.17): 1) τα πεπτίδια μιμητές της apoA-I (Ενότητα 1.6.1.3) και 2) τα ανασυγκροτημένα δισκοειδή HDL σωματίδια που παρασκευάζονται *in vitro* και περιέχουν την ανθρώπινη wt apoA-I ή την apoA-I Milano και φωσφολιπίδια (φωσφατυδιλοχολίνη ή σφιγγομυελίνη) (rHDL-apoA-I) (Ενότητα 1.6.1.4) [51] [398, 399]. Η apoA-I Milano είναι μία φυσικά απαντώμενη μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης apoA-I που σχετίζεται με μειωμένο καρδιαγγειακό κίνδυνο παρά τα χαμηλά επίπεδα HDL-C στο πλάσμα των φορέων, καθώς παρουσιάζει βελτιωμένη λειτουργικότητα σε σχέση με την wt apoA-I [400, 401].



Εικόνα 1.17: Θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν το μονοπάτι μεταβολισμού και τη λειτουργικότητα της HDL: 1) Έγχυση rHDL-αποΑ-I Milano, 2) Έγχυση rHDL-αποΑ-I wt, 3) Επαγωγείς ενδογενούς σύνθεσης της αροΑ-I, 4) Πεπτίδια μιμητές της αροΑ-I, 5) Απολιπιδιωμένη HDL (preβ-HDL σωματίδια), 6) Γονιδιακή θεραπεία (miR-33), 7) Συνθετικοί LXRα αγωνιστές, 8) Νιασίνη, 9) Συνθετικοί FXR (Farnesoid X receptor) αγωνιστές, 10) Αναστολείς της CEPT, 11) Αναστολείς της EL, 12) Ανασυνδυασμένη ανθρώπινη LCAT, 13) Συνθετικοί αγωνιστές των PPARs [390].

1.6.1.3 Ο αθηροπροστατευτικός ρόλος των πεπτιδίων μιμητών της αροΑ-I

Μία ποικιλία πεπτιδίων που προσομοιάζουν τη δευτεροταγή δομή της wt αροΑ-I του ανθρώπου έχουν αναπτυχθεί. Τα πεπτίδια μιμητές της αροΑ-I είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να έχουν μοναδικές δομικές ιδιότητες, οι οποίες τους παρέχουν αυξημένη ομολογία με την εγγενή αροΑ-I, υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με τα λιπίδια και βελτιωμένες αθηροπροστατευτικές ιδιότητες [98] [399].

In vitro μελέτες έδειξαν ότι πεπτίδια μιμητές 4F, D-4F, L-4F και FAMP5 και το ETC-642 (σύμπλοκο ενός πεπτιδίου μιμητή με φωσφολιπίδια) επάγουν την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα ποντικού ή/και ανθρώπου [402-404]. Σε συμφωνία με τα in vitro ευρήματα, τα πεπτίδια 4F, D-4F και L-4F και το 5A/PC (σύμπλοκο του πεπτιδίου μιμητή 5A με

φωσφατιδυλοχολίνη) αύξησαν την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης σε apoE $-/-$ ποντίκια [402] [405].

Προκλινικές μελέτες σε HAEC και apoE $-/-$ ή LDLR $-/-$ ποντίκια έδειξαν ότι τα πεπτιδία 4F, D-4F, L-4F, L-6F και FAMP5 έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες [277] [403] [406, 407]. Μελέτες σε κουνέλια με οξεία ή χρόνια φλεγμονή έδειξαν ότι τα ETC-642 και 5A/PC μειώνουν την έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του έσω χιτώνα της καρωτίδας, τη διήθηση των ουδετεροφίλων στον έσω χιτώνα και την παραγωγή ROS [168] [408, 409]. Σε συμφωνία με τα *in vivo* ερήματα, το ETC-642 εμπόδισε την επαγόμενη από τον TNF- α προσκόλληση των μονοκυττάρων στα HCAEC [408].

Μελέτες σε apoE $-/-$ ή LDLR $-/-$ ποντίκια ή υπερλιπιδαιμικά κουνέλια έδειξαν ότι η χορήγηση των πεπτιδίων 4F, D-4F, L-4F, L-6F και FAMP5 και των 5A/PC και ETC-642 εμποδίζει το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας στην αορτή και οδηγεί σε μείωση της αθηροσκλήρωσης [403-406] [410, 411].

Τα ενθαρρυντικά ευρήματα από την αξιολόγηση των πεπτιδίων μιμητών της apoA-I σε προκλινικές μελέτες υποδηλώνουν ότι αυτά αντιπροσωπεύουν μία υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την πρόληψη και θεραπεία της ASCAD. Ωστόσο, η πλειοψηφία των πεπτιδίων μιμητών της apoA-I δεν έχει αξιολογηθεί σε κλινικές μελέτες. Η πρώτη κλινική δοκιμή για το FX-5A προγραμματίζεται στο εγγύς μέλλον [412, 413]. Τέλος, παρά τα ενθαρρυντικά προκλινικά ευρήματα, δύο κλινικές μελέτες σε ασθενείς με CAD ή ασθενείς υψηλού κινδύνου με CVD κατέληξαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα του 4F να βελτιώνει τις αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της HDL, με αποτέλεσμα τη διακοπή της περαιτέρω ανάπτυξής του [399] [414, 415].

1.6.1.4 rHDL-apoA-I σωματίδια και μείωση αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ASCAD

1.6.1.4.1 Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες των rHDL-apoA-I σωματιδίων

Τα rHDL-apoA-I σωματίδια βελτιώνουν τη λειτουργικότητα της HDL και αυξάνουν τα επίπεδα των ώριμων λειτουργικών HDL3 σωματιδίων στο πλάσμα. Η έγχυση rHDL-apoA-I σωματιδίων στην κυκλοφορία του ανθρώπου οδηγεί σε μία γρήγορη, δόσοεξαρτώμενη και παροδική αύξηση των επιπέδων της apoA-I και των μικρών δισκοειδών pre- β HDL σωματιδίων του πλάσματος [416-418]. Η εν λόγω αύξηση οδηγεί σε αύξηση της ικανότητας του πλάσματος να επάγει εκροή χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς, με αποτέλεσμα την επαγωγή της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης στους ανθρώπους [188] [419-421]. Την έγχυση των rHDL-apoA-I σωματιδίων, ακολουθεί η γρήγορη αναδιαμόρφωσή τους μέσω αλληλεπίδρασης με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, τις

πρωτεΐνες και τα ένζυμα μεταφοράς λιπιδίων, η οποία καταλήγει στη μετατροπή τους σε ώριμα σφαιρικά λειτουργικά HDL σωματίδια και στην αύξηση των επιπέδων HDL3 του πλάσματος [188] [422]. Η έγχυση των rHDL-αροΑ-I σωματιδίων στην κυκλοφορία του ανθρώπου αποτελεί, επίσης, μία άμεση προσέγγιση για την ομαλοποίηση της διαταραγμένης δομικής σύστασης και λειτουργικότητας της δεξαμενής HDL του πλάσματος, και ως εκ τούτου έχει τη δυνατότητα να μειώνει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο που σχετίζεται με μη φυσιολογικό μεταβολισμό της HDL [398].

Προκλινικές *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Ενότητα 1.3.2) και κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι τα rHDL-αροΑ-I σωματίδια παρουσιάζουν όλες τις αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της εγγενούς HDL του πλάσματος, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα, τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, αντιαποπρωτικές και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, καθώς και την ικανότητα επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό [51] [139] [398] [423]. Επιπλέον, πλήθος μελετών έχει δείξει ότι η έγχυση rHDL-αροΑ-I σωματιδίων σε υγιείς ανθρώπους και ασθενείς με ASCAD ή AMI ενισχύει την ικανότητα της εγγενούς HDL του πλάσματος να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα και αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης [417] [421] [424-426]. Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η rHDL-αροΑ-I θα μπορούσε να αποτελέσει μία υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την ASCAD και τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου.

1.6.1.4.2 rHDL-αροΑ-I σωματίδια και μείωση καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ASCAD και πρόσφατο ACS

Τέσσερις μορφές rHDL-αροΑ-I που διαφέρουν ως προς την απολιποπρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση, τη θεραπευτική δοσολογία, τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική έχουν μελετηθεί σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της ASCAD και τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς που υπέστησαν ACS (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου) ή ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο: 1) Η ETC-216 (μετονομάστηκε σε MDCO-216 από το νέο κάτοχο της άδειας) αποτελεί σύμπλοκο ανασυνδυασμένης αροΑ-I Milano και POPC φωσφατιδυλοχολίνης (PC). 2) Η CER-001 αποτελείται από ανασυνδυασμένη wt ανθρώπινη αροΑ-I, σφιγγομυελίνη (SPM, sphingomyelin) και διφωσφατιδυλογλυκερόλη (DPPG, diphosphatidylglycerol). 3) Η CSL-111 και η 4) η CSL-112 αποτελούνται από την wt αροΑ-I που απομονώθηκε και καθαρίστηκε από πλάσμα ανθρώπου και φωσφατιδυλοχολίνη, η οποία προέρχεται από σόγια. Η CSL-112 (PC:αροΑ-I = 100:1) προσομοιάζει περισσότερο τα εγγενή HDL σωματίδια του πλάσματος του ανθρώπου σε σχέση με την CSL-111 (PC:αροΑ-I = 150:1) καθώς παρουσιάζει μειωμένη περιεκτικότητα σε

λιπίδια, με αποτέλεσμα η μοριακή αναλογία λιπιδίων προς την συνολική πρωτεΐνη να είναι μειωμένη [51] [139] [398] [423]. Παρακάτω, αναφέρονται τα ευρήματα της αξιολόγησης των τεσσάρων μορφών rHDL-apoA-I σε κλινικές μελέτες για τη μείωση της αθηροσκλήρωσης και του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ASCAD που υπέστησαν πρόσφατο ACS.

ETC-216 και MDCO-216

Δύο κλινικές μελέτες μικρής διάρκειας στις οποίες συμμετείχε μικρός αριθμός ασθενών (57 και 47, αντίστοιχα) έδειξαν ότι η ETC-216 προκαλεί σημαντική υποχώρηση της αθηροσκλήρωσης των στεφανιαίων αρτηριών, σε μέτριο όμως βαθμό. Ειδικότερα, η έγχυση ETC-216 για 5 εβδομάδες (5 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις, 15 mg/kg ή 45 mg/kg ανά έγχυση) σε ασθενείς που υπέστησαν πρόσφατο ACS μείωσε σημαντικά τον όγκο του αθηρώματος στις στεφανιαίες πλάκες (κατά 4.2% και 10.9%, αντίστοιχα) και το μέγεθος των αθηρωματικών πλακών συγκριτικά με τους ασθενείς-μάρτυρες που έλαβαν αλατούχο εικονικό φάρμακο [427, 428]. Ο μηχανισμός της αθηροπροστατευτικής δράσης της ETC-216 πιθανώς σχετίζεται με αύξηση της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από τις αθηρωματικές πλάκες στον ορό, καθώς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα HDL-C του πλάσματος των ασθενών που έλαβαν ETC-216 συγκριτικά με τους ασθενείς-μάρτυρες [427, 428]. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από μεταγενέστερες μελέτες που έδειξαν ότι η ETC-216 αυξάνει τη μεσολαβούμενη από τον ABCA1 εκροή χοληστερόλης σε υγιείς ανθρώπους και ασθενείς με CAD, και βελτιώνει την ικανότητα του ανθρώπινου ορού να επάγει εκροή χοληστερόλης μέσω του ABCA1 από τα μακροφάγα in vitro [429, 430]. Ωστόσο, σε μία μεταγενέστερη κλινική μελέτη φάσης III (MILANO-PLOT) στην οποία συμμετείχε μεγαλύτερος αριθμός ασθενών που υπέστησαν πρόσφατο ACS (122), η έγχυση MDCO-216 για 5 εβδομάδες (5 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις, 20mg/kg ανά έγχυση) δεν προκάλεσε υποχώρηση της αθηρωματικής πλάκας στις στεφανιαίες αρτηρίες συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο. Τα επίπεδα HDL-C στο πλάσμα των ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε MDCO-216 ήταν απροσδόκητα μειωμένα συγκριτικά με τους ασθενείς-μάρτυρες [431]. Η κύρια διαφορά μεταξύ της MILANO-PLOT μελέτης και των δύο προηγούμενων κλινικών μελετών ήταν ότι όλοι οι ασθενείς της πρώτης μελέτης μετά την εκδήλωση ACS λάμβαναν αγωγή με στατίνες συγχρόνως με τη χορήγηση MDCO-216. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η έγχυση MDCO-216 δε μειώνει τον υπολειπόμενο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε ασθενείς που υπέστησαν ACS οι οποίοι λαμβάνουν στατίνες [431]. Με βάση τα αποτελέσματα της MILANO-PLOT μελέτης, η ανάπτυξη της MDCO-216 για τη θεραπεία της ASCAD τερματίστηκε.

CER-001

Η CER-001 σχεδιάστηκε ώστε να μιμείται τη δομή των μικρών, φτωχών σε χοληστερόλη νεοσυντιθέμενων preβ-HDL σωματιδίων του πλάσματος του ανθρώπου [432]. Σε μία κλινική μελέτη φάσης II (CHI-SQUARE) που περιελάμβανε 507 ασθενείς με ACS, η έγχυση CER-001 για 6 εβδομάδες (6 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις, 3mg/kg ή 6mg/kg ή 12mg/kg ανά έγχυση) δε μείωσε τον όγκο του αθηρώματος στις πλάκες και δεν οδήγησε σε μείωση της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο [418]. Ομοίως, σε μία μεταγενέστερη κλινική μελέτη φάσης II (CARAT) στην οποία συμμετείχαν 301 ασθενείς που υπέστησαν πρόσφατο ACS και λάμβαναν αγωγή με στατίνες, η έγχυση CER-001 για 10 εβδομάδες (10 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις, 3mg/kg ανά έγχυση) δεν οδήγησε σε μείωση του όγκου του αθηρώματος στις πλάκες και σε υποχώρηση της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα HDL-C του πλάσματος μεταξύ των ασθενών που λάμβαναν CER-001 και των ασθενείς-μαρτύρων [433]. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η ανάπτυξη της CER-001 για τη θεραπεία της ASCAD τερματίστηκε.

Αντίθετα, δύο κλινικές μελέτες φάσης II στις οποίες συμμετείχε μικρός αριθμός ασθενών έδειξαν ότι η χορήγηση CER-001 για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα οδηγεί σε υποχώρηση της αθηροσκλήρωσης στις καρωτίδες [419] [434]. Ειδικότερα, η έγχυση CER-001 (12 ενδοφλέβιες εγχύσεις δύο φορές την εβδομάδα, 8 mg/kg ανά έγχυση) για 6 μήνες σε 23 ασθενείς με ομόζυγη FH μείωσε τη μέση επιφάνεια και το μέσο πάχος του αγγειακού τοιχώματος των καρωτίδων συγκριτικά με εικονικό φάρμακο [434]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η έγχυση CER-001 (20 ενδοφλέβιες εγχύσεις, 8 mg/kg ανά έγχυση) για 6 μήνες σε 7 ασθενείς με οικογενή υποαλφα-λιποπρωτεϊναιμία (FHA, familial hyper-alpha-lipoproteinemia: πολύ χαμηλά επίπεδα HDL-C πλάσματος και μειωμένη ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τους ιστούς) οδήγησε σε μείωση της μέσης επιφάνειας, του πάχους και της φλεγμονής του αγγειακού τοιχώματος των καρωτίδων συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο. Επιπλέον, η CER-001 αύξησε την ικανότητα του πλάσματος των ασθενών να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα *in vitro*. Ομοίως, παρατηρήθηκε επαγωγή της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης στους ασθενείς που λάμβαναν CER-001 [419]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, μετεγενέστερες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η CER-001 επάγει τη μεσολαβούμενη από το πλάσμα εκροή χοληστερόλης και την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης σε υγιείς ανθρώπους ή ασθενείς με ASCAD [421] [426]. Αντίθετα, σε μία μεταγενέστερη κλινική μελέτη φάσης III, η έγχυση CER-001 για 6 μήνες (9 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις ακολουθούμενες από εγχύσεις κάθε δύο εβδομάδες, 8

mg/kg ανά έγχυση) σε 30 ασθενείς με FHA δε μείωσε τη μέση επιφάνεια, το πάχος και τη φλεγμονή του αρτηριακού τοιχώματος των καρωτίδων συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο, υποδεικνύοντας ότι η CER-001 δε μειώνει την αθηροσκλήρωση των καρωτίδων [435].

CSL-111 και CSL-112

Σε μία κλινική μελέτη φάσης II (ERASE) όπου συμμετείχαν 183 ασθενείς που υπέστησαν πρόσφατο ACS, η έγχυση CSL-111 για 4 εβδομάδες (4 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις) σε συγκέντρωση 40mg/kg δε μείωσε τον όγκο του αθηρώματος στις στεφανιαίες αρτηρίες και το μέγεθος των αθηρωματικών πλακών, ενώ σε συγκέντρωση 80mg/kg προκάλεσε υψηλή αύξηση των ηπατικών τρανσαμινασών συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο [436]. Σε μία μεταγενέστερη κλινική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 29 ασθενείς με ACS, η έγχυση CSL-111 (μονή ενδοβλέβια έγχυση 80mg/kg) δεν οδήγησε σε μείωση της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες και σε αύξηση της αγγειοδιαστολής συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο. Ωστόσο, η έγχυση CSL-111 αύξησε σημαντικά την HDL-C (64%) στο πλάσμα [437]. Η ανεπαρκής αποτελεσματικότητα της CSL-111 να μειώσει τη στεφανιαία αθηροσκλήρωση σε ασθενείς με ACS σε συνδυασμό με την προκαλούμενη ηπατοτοξικότητα οδήγησε σε διακοπή της περαιτέρω αξιολόγησής της σε κλινικές δοκιμές και στον επακόλουθο σχεδιασμό της δεύτερης γενιάς rHDL-apoA-I, την CSL-112 [48].

Πολυάριθμες κλινικές μελέτες σε υγιή άτομα και ασθενείς με ASCAD ή πρόσφατο AMI έδειξαν ότι η έγχυση CSL-112 (μονή ή πολλαπλές ενδοφλέβιες εγχύσεις) δεν προκαλεί παρενέργειες και δε συσχετίζεται με αύξηση ηπατικών τρανσαμινασών και κρεατινίνης ορού. Κλινικές μελέτες φάσης II και III, μεταξύ των οποίων η AEGIS-I, έδειξαν ότι η ενδοφλέβια έγχυση CSL-112 σε ασθενείς με ASCAD και πρόσφατο AMI οδηγεί σε αύξηση της ικανότητας του πλάσματος να επάγει εκροή χοληστερολής από τα κύτταρα, κυρίως μέσω του ABCA1, και σε επαγωγή της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από τις αθηρωματικές πλάκες στον ορό [416] [424, 425] [438, 439]. Ωστόσο, στην κλινική μελέτη φάσης II AEGIS-I όπου συμμετείχαν 1258 ασθενείς με πρόσφατο AMI, η έγχυση CSL-112 (4 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις, 2g ή 6g ανά έγχυση) για 4 εβδομάδες δε μείωσε τον κίνδυνο μείζονων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβαμάτων συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο [425]. Η κλινική μελέτη φάσης III AEGIS-II (NCT03473223) στην οποία συμμετέχουν 17400 ασθενείς που υπέστησαν πρόσφατο AMI βρίσκεται σε εξέλιξη και αναμένεται να ολοκληρωθεί μέσα στο 2022, προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η επίδραση της CSL-112 (4 εβδομαδιαίες ενδοφλέβιες εγχύσεις, 6g ανά έγχυση) στη μείωση του κινδύνου μείζονων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβαμάτων και στη

σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας [51] [423].

Συμπερασματικά, με βάση τις προαναφερόμενες μελέτες, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει μία μεγάλου μεγέθους κλινική μελέτη που να επιβεβαιώνει ότι η θεραπεία με rHDL-apoA-I, όπως έχει σχεδιαστεί επί του παρόντος, οδηγεί σε μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με πρόσφατο ACS. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η πλειοψηφία των προαναφερόμενων μελετών πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με σταθερή ASCAD που υπέστησαν πρόσφατο ACS. Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονται από αθηρωματικό περιβάλλον με σημαντικές διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών και με παρουσία μη λειτουργικής/δυσλειτουργικής HDL (Ενότητα 1.4.1). Το περιβάλλον αυτό πιθανώς να επηρεάζει τη λειτουργικότητα των νεοσυντιθέμενων ή εγχυόμενων HDL σωματιδίων. Εάν τα εγχυόμενα HDL σωματίδια αναδιαμορφώνονται γρήγορα στην κυκλοφορία ώστε να προστεθούν στην υπάρχουσα δεξαμενή προαθηρογόνου HDL στο πλάσμα, μια τέτοια διαδικασία θέτει σε κίνδυνο την αντιαθηρογόνο δράση της rHDL-apoA-I θεραπείας. Ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να μειώσει τα αθηροπροστατευτικά οφέλη της rHDL-apoA-I θεραπείας σε ασθενείς με πρόσφατο ACS είναι η ταυτόχρονη αγωγή με στατίνες [51]. Όντως, η φαρμακευτική αύξηση των επιπέδων της HDL οδήγησε σε μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών συμβαμάτων μόνο σε ασθενείς που δεν λάμβαναν παράλληλα αγωγή με στατίνες [440].

1.6.1.5 Μελλοντικές κατευθύνσεις για τη θεραπεία της ASCAD: νέες μορφές rHDL με βελτιωμένη πρωτεϊνική/λιπιδική σύσταση και ενισχυμένες αθηροπροστατευτικές λειτουργίες

Η έγχυση των διαφόρων μορφών rHDL-apoA-I, όπως προαναφέρθηκε, βελτιώνει αρκετές αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL, όπως την ικανότητά της να επάγει εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, και με τον τρόπο αυτό ενισχύει τη λειτουργικότητα της HDL. Οι διάφορες μορφές rHDL που έχουν αξιολογηθεί μέχρι σήμερα τυπικά περιέχουν apoA-I και φωσφατιδυλοχολίνη. Η ερευνητική κοινότητα πλέον εστιάζεται στο σχεδιασμό νέων αποτελεσματικών rHDL σκευασμάτων με ενισχυμένες βιολογικές δράσεις. Η προσέγγιση αυτή προϋποθέτει τη βελτιστοποίηση της πρωτεϊνικής και λιπιδικής σύστασης της rHDL με βάση τις σχέσεις δομής-λειτουργίας. Τα νέας γενιάς rHDL σκευάσματα θα μπορούσαν να περιέχουν, εκτός από την apoA-I, επιπλέον πρωτεΐνες οι οποίες βελτιώνουν τη λειτουργία της HDL in vitro, όπως η apoE, apoA-IV, apoM, apoJ, LCAT και PON1 [398]. Η ενσωμάτωση βιολογικά ενεργών φωσφολιπιδίων στην rHDL, όπως η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG, phosphatidylglycerol), φωσφατιδυλοινωσιτόλη

(PI, phosphatidylinositol), φωσφατιδυλοσερίνη (PS, phosphatidylserine) και η S1P, βελτιώνει σημαντικά τις αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της rHDL in vitro, και έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τη θεραπευτική της αποτελεσματικότητα in vivo. Οι νέες μορφές rHDL με βελτιωμένη πρωτεϊνική (apoA-I και επιπλέον apoE, apoA-IV, apoM, apoJ, LCAT ή PON1) και λιπιδική σύσταση (PG, PI, PS ή S1P εκτός από φωσφατιδυλοχολίνη) θα μπορούσαν να έχουν ενισχυμένες αθηροπροστατευτικές λειτουργίες και με τον τρόπο αυτό να αποτελέσουν υποσχόμενες μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της ASCAD [139] [398].

1.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της αθηροσκλήρωσης που στοχεύουν την apoE: πεπτίδια-μιμητές της apoE

Η έρευνα εστιάζεται στην ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι της ASCAD που θα μειώνουν τα επίπεδα των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών στην κυκλοφορία και παράλληλα θα αυξάνουν τη λειτουργικότητα της HDL. Μεταξύ αυτών, ένα αριθμός συνθετικών πεπτιδίων που μιμούνται τη δομή της φυσικού τύπου apoE του ανθρώπου έχουν σχεδιαστεί. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα πεπτίδια μιμητές της apoE είναι λειτουργικά παρόμοια με την apoE, και επομένως, έχουν πολυάριθμες αθηροπροστατευτικές δράσεις [320]. Ένας μεγάλος αριθμός των πεπτιδίων αυτών έχει αξιολογηθεί σε προκλινικές μελέτες, ενώ μερικά από αυτά αξιολογούνται ήδη σε κλινικές δοκιμές φάσης II. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πεπτίδιο Ac-hE18A-NH₂ που έλαβε άδεια χρήσης ως “ορφανό φάρμακο” με την εμπορική ονομασία AEM-28 [441].

Τα πεπτίδια μιμητές της apoE μειώνουν τα επίπεδα των αθηρογόνων πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών και της TC στο πλάσμα. Ποικίλες μελέτες σε apoE -/- ή LDLR -/- ή apoE -/- x LDLR -/- ποντίκια και σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια έδειξαν δείξει ότι η χορήγηση των πεπτιδίων Ac-hE18A-NH₂, hEr και mR18L επάγει ηπατική κάθαρση των VLDL και LDL της κυκλοφορίας και, επακόλουθα, οδηγεί στη μείωση των επιπέδων VLDL-C, LDL-C, τριγλυκεριδίων και TC στο πλάσμα [442-445]. Η χορήγηση του AEM-28 σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς με υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου II οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων VLDL-C και τριγλυκεριδίων του πλάσματος, ενώ η ικανότητα του να μειώνει τα επίπεδα TC στο πλάσμα ασθενών με ομόζυγη FH αξιολογείται σε μια κλινική μελέτη υπό εξέλιξη [446]. Νέα πεπτίδια σχεδιάζονται ώστε να φέρουν χημικές τροποποιήσεις στο N αμινο-τελικό άκρο του Ac-hE18A-NH₂, το οποίο περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στον LDLR που είναι απαραίτητη για την ηπατική κάθαρση των υπολειμμάτων των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών [447]. Μελέτες σε apoE -/- ποντίκια και υπερχοληστερολαιμικούς μακάκους έδειξαν ότι τα τροποποιημένα αυτά πεπτίδια (π.χ. το AEM-28) είναι πιο αποτελεσματικά στη μείωση της TC του πλάσματος σε χαμηλότερες

δόσεις συγκριτικά με το Ac-hE18A-NH2 [447, 448].

Τα πεπτίδια μιμητές της apoE επάγουν την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης με παρόμοια ή ακόμη υψηλότερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με την ανθρώπινη apoE ή apoA-I. In vitro μελέτες έδειξαν ότι τα ATI-5261, CS-6253, ErK και Ac-hE18A-NH2 επάγουν την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα ποντικού ή ανθρώπου που μεσολαβείται από τον ABCA1 ή άλλους μηχανισμούς [449-452]. Ομοίως, η χορήγηση ATI-5261 σε apoE ^{-/-} ποντίκια οδήγησε σε επαγωγή της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από τα μακροφάγα [449]. Τα πεπτίδια μιμητές της apoE έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Το Ac-hE18A-NH2 κατέστειλε την επαγόμενη από το LPS έκφραση του VCAM-1 στα HUVEC και μείωσε την προσκόλληση των μονοκυττάρων σε αυτά [453]. Η χορήγηση Ac-hE18A-NH2 ή AEM-2 ή ErK σε THP-1 μακροφάγα ανθρώπου ή ποντικού και σε πρωτογενή περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού εμπόδισε την επαγόμενη από το LPS έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης (TNF-α, IL-6, IL-1b, MCP-1) [448] [452-455]. Σε συμφωνία με τα in vitro ευρήματα, η χορήγηση mR18L σε νορμολιπιδαιμικούς αρουραίους μείωσε την επαγόμενη από το LPS αύξηση των επιπέδων TNF-α και IL-6 στο πλάσμα [445]. Η ηπατική υπερέκφραση του ErK ή hEr σε apoE ^{-/-} ποντίκια και η χορήγηση Ac-hE18A-NH2 και mR18L σε δυσλιπιδαιμικά κουνέλια και νορμολιπιδαιμικούς αρουραίους, αντίστοιχα, οδήγησαν σε αύξηση της ενεργότητας της PON-1 στο πλάσμα, ενώ μείωσαν την ενεργότητα της MPO (myeloperoxidase) του πλάσματος [443] [445] [454].

Τα πεπτίδια μιμητές της apoE εμφανίζουν αντιοξειδωτικές δράσεις. Η χορήγηση Ac-hE18A-NH2 σε apoE ^{-/-} ποντίκια και σε δυσλιπιδαιμικά κουνέλια μείωσε τα επίπεδα LOOH στο πλάσμα, ενώ οδήγησε σε μείωση των επιπέδων ROS στο πλάσμα LDLR ^{-/-} ποντικών [443, 444] [456].

Τα πεπτίδια μιμητές της apoE μειώνουν την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε δυσλιπιδαιμικά μοντέλα ποντικών με προϋπάρχουσες αθηρωματικές βλάβες/αλλοιώσεις. Η χορήγηση ATI-5261 ή Ac-hE18A-NH2 ή mR18L και η ηπατική υπερέκφραση του hEr σε LDLR ^{-/-} ή/και apoE ^{-/-} ποντίκια οδήγησαν σε μείωση του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών στις αορτές. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί περιελάμβαναν τη μείωση της TC στο πλάσμα, την αύξηση της εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα της αθηρωματικής πλάκας καθώς και τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες [444] [449] [454] [456]. Συμπερασματικά, τα πεπτίδια μιμητές της apoE αντιπροσωπεύουν μία υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την πρόληψη και θεραπεία της ASCAD.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αξιολόγηση της αθηροπροστατευτικής προοπτικής της ανασυγκροτημένης HDL που περιέχει ανθρώπινη απολιποπρωτεΐνη E3 (apoE3) και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3) σε κυτταρικό, μοριακό και λειτουργικό επίπεδο. Οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί που εντοπίστηκαν να εμπλέκονται στη δράση της rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα διερευνήθηκαν σε βάθος και σε πολλαπλά επίπεδα με πλειάδα εργαστηριακών τεχνικών. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από σφαιρικές γονδιωματικές αναλύσεις σε επίπεδο RNA, προχωρήσαμε σε στοχευμένες αναλύσεις πρωτεϊνικής έκφρασης και ενεργοποίησης καίριων σηματοδοτικών μονοπατιών, και ολοκληρώσαμε με εύρος λειτουργικών αξιολογήσεων σε κυτταρικό επίπεδο. Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πρώιμα στάδια της επανενδοθηλιοποίησης των αθηρωματικών αγγείων και στην προστασία από την αθηροσκλήρωση, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στους μοριακούς μηχανισμούς μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων που ενεργοποιούνται από την rHDL-apoE3 και στον προσδιορισμό των μορίων-ρυθμιστών που εμπλέκονται στη δράση αυτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα που περιγράφονται στις Ενότητες 3.1, 3.15.1, 3.16-3.18 και 3.20 είχαν προηγηθεί της έναρξης της παρούσας διδακτορικής διατριβής και πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του Εργαστηρίου του Καθηγητή κ. Β. Ζαννή στον Τομέα Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Βοστώνης. Τα πειράματα που περιγράφονται στις Ενότητες 3.2-3.12 και 3.14 πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο της Διευθύντριας Ερευνών κα Α. Χρόνη του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Όλα τα υπόλοιπα πειράματα που αποτελούν το κύριο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κα Δ. Σανούδου στον Τομέα Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3.1. Έκφραση, παραγωγή και καθαρισμός της αρoE3 με τη χρήση του ευκαρυωτικού συστήματος έκφρασης μέσω ανασυνδυασμένου αδενοϊού

Υλικά: Βακτηριακά κύτταρα *Escherichia Coli* (E.Coli) BJ 5183 (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), φορέας pAdTrack-CMV (Aligent), πλασμίδιο pAdEasy-1 (Aligent), δεκτικά E.Coli κύτταρα DH5α (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), ενδονουκλεάση περιορισμού PacI (New England Biolabs Inc.), HEK-293 κύτταρα (ATCC), καναμυκίνη (Applichem), HER (Human Embryonic Retinoblasts) 911 κύτταρα, χλωριούχου καΐσιο (CsCl_2) (Sigma-Aldrich), ανθρώπινα HTB-13 κύτταρα αστροκυττώματος (SW 1783) (ATCC), θρεπτικό υλικό Leibovitz' s L-15, πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας HTB-13 κυττάρων (θρεπτικό υλικό Leibovitz' s L-15 που περιέχει 10% (v/v) FBS) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), θειικής δεξτράνης (Amersham Biosciences), σεφαρόζη (Sephargose 6B) (Amersham Biosciences), στήλη καθαρισμού (Bio-Rad), μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους μικρότερου από 12-14kDa (MWCO 12-14kDa) (Sigma-Aldrich, 0,3mL/cm), όξινο ανθρακικό αμμώνιο NH_4HCO_3 (Sigma-Aldrich), διάλυμα NH_4HCO_3 1M (φιλτράρεται με 0.2μM φίλτρο και αποθηκεύεται στους 4°C). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική αποδιάταξη της αρoE3 παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης και την επακόλουθη επαναδιάταξή της, καθώς και αυτά για την παρασκευή των rHDL-αρoE3 σωματιδίων αναφέρονται στην Ενότητα 3.10.

3.1.1. Κατασκευή ανασυνδυασμένου αδενοϊού που εκφράζει την αρoE3 του ανθρώπου

Το cDNA της άγριου τύπου αρoE3 του ανθρώπου κλωνοποιήθηκε στο φορέα pAdTrack. Ο ανασυνδυασμένος αδενοϊός που φέρει το γονίδιο έκφρασης της αρoE3 (pAdTrack- αρoE3) παρήχθη σε μεγάλη κλίμακα με το σύστημα AdEasy-1 [457, 458]. Αναλυτικότερα, ο ανασυνδυασμένος αδενοϊός pAdTrack- αρoE3 χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των

βακτηριακών κυττάρων Escherichia Coli (E.Coli) BJ 5183 μαζί με το πλασμίδιο pAdEasy-1 που φέρει το γονιδίωμα του αδενοϊού χωρίς τα γονίδια αναδιπλασιασμού E1 και E3 [457, 458]. Έγινε επιλογή των μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που ήταν ανθεκτικοί στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο φορέας του αδενοϊού που εκφράζει την αρoE3 πολλαπλασιάστηκε σε δεκτικά E.Coli κύτταρα DH5α και ακολούθησε πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με την ενδονουκλεάση περιορισμού PacI. Το ευθυγραμμισμένο με την PacI ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς πακεταρίσματος αδενοϊών HER 911 [114]. Στα κύτταρα 911 ο ανασυνδυασμένος αδενοϊός πακετάρεται σε ιοσωμάτια και τα κύτταρα λύνονται [459]. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάστηκε ο ανασυνδυασμένος αδενοϊός που εκφράζει την ανθρώπινη αρoE3. Ακολούθησε μεγάλης κλίμακας επιμόλυνση των HEK-293 κυττάρων με τον αδενοϊό αυτό. Στα HEK-293 κύτταρα που εκφράζουν τον ανασυνδυασμένο αδενοϊό, αυτός παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα [114]. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ανασυνδυασμένου αδενοϊού από τα κύτταρα και καθαρισμός του μέσω δύο διαδοχικών σταδίων υπερφυγοκέντρωσης σε διαβάθμιση χλωριούχου καισίου (CsCl₂) και ακολούθησε διαπύδιση, όπως έχει περιγραφθεί σε προηγούμενες μελέτες [128]. Τέλος, ο ανασυνδυασμένος αδενοϊός τιτλοδοτήθηκε με τη δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών, η οποία έχει περιγραφθεί προηγουμένως [128] [460].

3.1.2. Παραγωγή της αρoE3 με τη χρήση του ευκαρυωτικού συστήματος έκφρασης μέσω ανασυνδυασμένου αδενοϊού

Ανθρώπινα HTB-13 κύτταρα αστροκυττώματος (SW 1783), τα οποία δεν εκφράζουν την αρoE, επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό που εκφράζει την ανθρώπινη αρoE3 (Ενότητα 3.1.1). Στα HTB-13 κύτταρα ο ιός δεν πακετάρεται όποτε αυτά δε λύνονται, με αποτέλεσμα να παράγουν σε μεγάλη ποσότητα την αρoE3 και να την εκκρίνουν στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (βλ. Υλικά Ενότητας 3.1). Μετά από 24h από την επιμόλυνση, έγινε έκπλυση (2 φορές) των κυττάρων με θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει FBS, και τα κύτταρα προεπωάστηκαν για 30min σε θρεπτικό υλικό ίδιας σύστασης. Ακολούθησε προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού απουσία FBS στα κύτταρα. Μετά από 24h, το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε και προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει FBS στα κύτταρα. Η διαδικασία της συλλογής θρεπτικού υλικού καλλιέργειας από τα επιμολυσμένα HTB-13 κύτταρα που εκφράζουν την ανθρώπινη αρoE3 και της εκ νέου προσθήκης φρέσκου θρεπτικού υλικού απουσία FBS στα κύτταρα επαναλήφθηκε 8 φορές [114].

3.1.3. Καθαρισμός της παραγόμενης apoE3 με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και παρασκευή ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL που περιέχουν apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3)

Ακολούθησε καθαρισμός της ανθρώπινης apoE3 από το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των επιμολυσμένων HTB-13 κυττάρων που την εκφράζουν (Ενότητα 3.1.2) με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε στήλη θειϊκής δεξτράνης-σεφαρόζης, όπως έχει περιγραφθεί σε προηγούμενες μελέτες [119]. Τα κλάσματα της παραγόμενης apoE3 αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση), ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης (Ενότητα 3.13.1). Τα κλάσματα της apoE3 με καθαρότητα > 95% ενώθηκαν και ακολουθήθηκε διαπίδυση σε διάλυμα NH₄HCO₃ 5mM. Η παραγόμενη apoE3 υπέστη λυοφιλοποίηση και αποθηκεύτηκε στους -80°C [119].

Η παραχθείσα apoE3 υπέστη χημική αποδιάταξη παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης και επακόλουθη επαναδιάταξη. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην Ενότητα 3.10.1. Ακολούθησε η παρασκευή δισκοειδών ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων τύπου HDL που περιέχουν ανθρώπινη αναδιπλωμένη apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3) σε μοριακή αναλογία 100:1 (φωσφολιπίδια:apoE3) με τη μέθοδο διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου, όπως έχει περιγραφθεί σε προηγούμενες μελέτες [461, 462]. Το πρωτόκολλο παρασκευής των rHDL-apoE3 σωματιδίων που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην Ενότητα 3.10.2. Ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο ποιοτικός έλεγχος των rHDL-apoE3 σωματιδίων (Ενότητα 3.11). Η συγκέντρωση της apoE3 των rHDL-apoE3 σωματιδίων προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική δοκιμασία Lowry, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 3.12.3. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων στα rHDL-apoE3 σωματίδια χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική φωτομετρική μέθοδος που περιγράφεται στην Ενότητα 3.12.5. Ο επιτυχής σχηματισμός των rHDL-apoE3 σωματιδίων επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες στους 4°C, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 3.13.2. Τα rHDL-apoE3 σωματίδια που περιείχαν την apoE3 η οποία παράχθηκε σε ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης μέσω ανασυνδυασμένου αδενοϊού (Ενότητα 3.1.2) χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των μικροσυστοιχιών (Ενότητα 3.18) και της ποσοτικής RT-PCR (qRT-PCR) (Ενότητα 3.20), και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε με βάση την περιεχόμενη ποσότητα της apoE3.

3.2. Έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-aroE3 σε βακτηριακό σύστημα E.Coli

Υλικά: Επιδεκτικά για μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα E.Coli - BL21-Gold (DE3), πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο έκφρασης της άγριου τύπου apoE3 του ανθρώπου (pET32a-E3wt/3C), διάλυμα αμπικιλίνης (Appllichem) σε ddH₂O 100mg/mL, θρεπτικό υλικό LB-άγαρ (200mL): 4gr LB (Appllichem/Q BIOgene) και 3gr άγαρ για βακτηριολογία (Sigma-Aldrich) σε 200ml dH₂O, ακολουθεί αποστείρωση και προσθήκη αμπικιλίνης σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL, αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB 200mL: 4gr LB (Appllichem/Q BIOgene) σε 200mL dH₂O (χρησιμοποιείται προθερμασμένο στους 37°C), αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB 1L: 20gr LB (Appllichem/Q BIOgene) σε 1L dH₂O (χρησιμοποιείται προθερμασμένο στους 37°C), 100mM ισοπρόπυλ-β-D-θειογαλακτοσίδιο σε ddH₂O 100mg/mL (IPTG), πιπέτες όγκου έως 2μL, 10μL, 20μL, 200μL και 1000μL (Erppendorf), αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών (Sarstedt), ηλεκτρικός πιπεταδόρος αυτόματης αναρρόφησης και εκροής (Erppendorf), αποστειρωμένα σιφώνια όγκου 2mL, 5mL, 10mL, 25mL (Sarstedt), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 15mL και 50mL (Greiner), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erppendorf όγκου 1,5mL (Kisker Biotech), αποστειρωμένα τρυβλιά (Greiner Bio-one), γυάλινες κωνικές φυάλες όγκου 2L (Isolab), πλαστικές κυψελίδες πολυστυρενίου (Greiner Bio-one), ζεύγος Κυψελίδων Quartz (Fisher Scientific), πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου (250mL) (Thermo Scientific), διάλυμα, αιθανόλης 70% (v/v), λύχνος, επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech), ψυχόμενη φυγόκεντρος 2800 KUBOTA, ψυχόμενη φυγόκεντρος RC5C Plus Sorvall (GSA10 κεφαλή), ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος Heraecus Biofuge Pico, φωτόμετρο (Helios), Φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer (USA) Lambda 35 UV/VIS, αυτόκαυστο (Sanyo, Labo Autoclave).

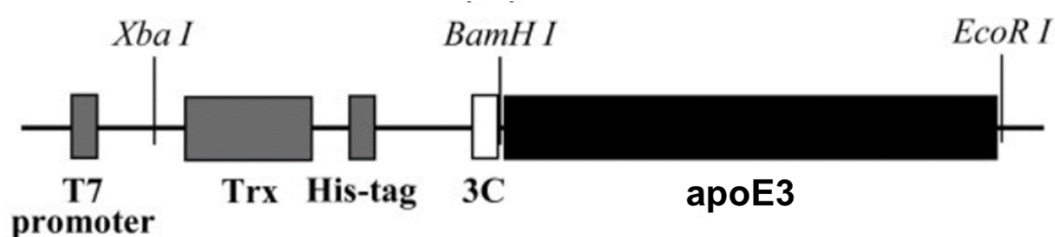
3.2.1. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.Coli με τον πλασμιδιακό φορέα pET32a-E3wt/3C

Για τη μελέτη γονιδίων ή τμημάτων DNA ή των πρωτεϊνών που αυτά εκφράζουν, πραγματοποιείται κλωνοποίηση του γενωμικού υλικού σε βακτήρια. Το σύστημα των βακτηρίων επιτρέπει το γρήγορο πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα γρήγορη απομόνωση ή έκφραση γονιδίων. Στα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έλαβε χώρα η έκφραση της apoE3 του ανθρώπου σε βακτηριακά κύτταρα E.Coli σύμφωνα με εγκαθιδρυμένη μέθοδο του εργαστηρίου της Δρ. Χρόνη Αγγελικής, Ερευνήτριας Α' στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» [462, 463]. Ο πλασμιδιακός φορέας pET32a-E3wt/3C που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από το εργαστήριο της Δρ. Χρόνη Α. [462, 463]. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός (η ενσωμάτωση

ξένου γενωμικού υλικού στο βακτήριο) των επιδεκτικών ως προς μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων E.Coli, BL21-Gold (DE3), με τον πλασμιδιακό φορέα «pET32a-E3wt/3C». Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει το cDNA της άγριου τύπου (wt) apoE3 του ανθρώπου. Η apoE3 που εκφράζεται από τον φορέα pEt32a-E3wt/3C είναι χμαιρική, καθώς φέρει την αμινοξική αλληλουχία της θειορεδοξίνης 1 (Trx) η οποία συνδέεται μέσω ενός ολιγοπεπτιδίου με την ετικέτα των 6 καταλοίπων ιστιδίνης (6 His-tag) της apoE3. Επιπλέον, καθοδικά της ετικέτας His-tag και ανοδικά της apoE3 φέρει μία αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την His-3C πρωτεάση (Εικόνα 3.1). Η σύντηξη της apoE3 με τη θειορεδοξίνη, μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη μοριακού βάρους 18kDa, την καθιστά υδατοδιαλυτή, με αποτέλεσμα να μπορεί να παραμένει στο διαλυτό (υδατικό) κλάσμα του λύματος των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων κατά την απομόνωσή της (Ενότητα 3.4). Ο φορέας pEt32a-E3wt/3C περιέχει, επίσης, τον υποκινητή T7 που επιτρέπει την έκφραση σε υψηλά επίπεδα της χμαιρικής Trx-apoE3 πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού λύματος (Εικόνα 3.1) [463]. Η ετικέτα 6 His-tag της apoE3 είναι απαραίτητη για τον καθαρισμό της χμαιρικής apoE3 στο διαλυτό κλάσμα του λύματος μέσω χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη ρητίνης νικελίου (Ενότητα 3.5). Η παρουσία αλληλουχίας που αναγνωρίζεται από την His-3C πρωτεάση επιτρέπει την επιλεκτική αντίδραση πέψης της χμαιρικής apoE3 από την πρωτεάση, ώστε να απομονωθεί η apoE3 (Ενότητα 3.6). Ο φορέας «pET32a-E3wt/3C» φέρει, επίσης, το γονίδιο της β-λακταμάση, η έκφραση του οποίου προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, ώστε να είναι εφικτή η διάκριση των μετασχηματισμένων από των μη μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων [463]. Τα BL21-Gold (DE3) κύτταρα που υφίστανται μετασχηματισμό έχουν καταστεί επιδεκτικά μετά από επίδραση με ιόντα ασβεστίου, ώστε να μπορούν με μεταβολή της θερμοκρασίας να εισαγάγουν στο εσωτερικό τους τον φορέα κλωνοποίησης μέσω οπών που φέρουν στην πλασματική τους μεμβράνη προς έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

Η πειραματική πορεία του μετασχηματισμού των επιδεκτικών κυττάρων που ακολουθείται είναι η εξής: Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού απαιτείται 1μL από τον πλασμιδιακό φορέα «pEt32a-E3wt» και αιώρημα 50μL των BL21-Gold (DE3) κυττάρων. Συγκεκριμένα, μεταφέρονται τα επιδεκτικά κύτταρα BL21-Gold (DE3) από τους -80°C, όπου φυλλάσσονται, σε πάγο για να αποψυχθούν. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου errendorf που περιέχει 50μL επιδεκτικών κυττάρων, υπό στείρες συνθήκες, προστίθεται 1μL (~100-150ng) του φορέα «pEt32a-E3wt», ακολουθεί ήπια ανάμιξη και επώαση της αντίδρασης μετασχηματισμού στον πάγο για 30min. Ακολουθεί επώαση στους 42°C για 45sec («θερμικό

σοκ»), ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων και να επιτραπεί η εισαγωγή του φορέα «pET32a-E3wt/3C» στο εσωτερικό τους. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 2min, αναδιάλυση των συστατικών της αντίδρασης μετασχηματισμού σε 950μL θρεπτικού υλικού LB, υπό στείρες συνθήκες, και επώαση στους 37 °C για 1h υπό ανάδευση (220rpm). Κατόπιν, γίνεται επίστρωση των ανασυδρασμένων βακτηρίων (200μL), υπό στείρες συνθήκες, σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει άγαρ και LB (LB-άγαρ) με αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL. Το υπόλοιπο εναιώρημα των μετασχηματισμένων βακτηρίων φυγοκεντρείται στα 5.000rpm για 5min στους 4°C. Ακολουθεί απομάκρυνση υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 100μL θρεπτικού υλικού LB και επίστρωση του κυτταρικού εναιωρήματος σε τρυβλία LB-άγαρ με αμπικιλίνη (100μg/mL). Τέλος, λαμβάνει χώρα επώαση των επιστρωμένων τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτήρια στους 37 °C για 16h. Για τον έλεγχο τυχόν μόλυνσης χρησιμοποιείται και ένας δεύτερος πληθυσμός BL21-Gold (DE3) κυττάρων που υφίσταται την ίδια διαδικασία με τα κύτταρα που θα μετασχηματιστούν εκτός από την προσθήκη του πλασμιδιακού φορέα (δείγμα-μάρτυρας, «τυφλό»).



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση της χιμαιρικής Trx-apoE3 που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pEt32a-E3wt/3C (τροποποιημένη από: [463]).

3.2.2. Καλλιέργεια μικρής και μεγάλης κλίμακας των μετασχηματισμένων BL21-Gold (DE3) κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα «pET32a-E3wt/3C»

Την επόμενη μέρα, εφ' όσον ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων BL21-Gold (DE3) με τον πλασμιδιακό φορέα «pET32a-E3wt/3C» ήταν επιτυχής, έχουν αναπτυχθεί βακτηριακές αποικίες στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού των τρυβλίων. Με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ρύγχους (200μL) επιλέγεται μία στικτή αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων και ακολουθεί εμβολιασμός σε 5 mL θρεπτικού υλικού LB με αμπικιλίνη (100μg/mL) (καλλιέργεια μικρής κλίμακας), υπο στείρες συνθήκες, το οποίο περιέχεται σε κάθε ένα από τα τρία αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon (των 50mL). Παράλληλα σε ένα άλλο σωληνάριο, μεταφέρονται 5 mL LB με αμπικιλίνη (100μg/mL) και

χρησιμοποιούνται ως δείγμα-μάρτυρας («τυφλό»), καθώς δεν εισάγεται αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο και επωάζονται στους 37°C για 3-4h με ανακίνηση στα 220rpm. Οι καλλιέργειες απομακρύνονται από τον επωαστικό κλίβανο όταν θολώσουν σε σχέση με το δείγμα «τυφλό». Τότε, η απορρόφησή τους στα 600nm, η οποία προσδιορίζει την ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας, κυμαίνεται μεταξύ 0,4-0,6. Οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας αποθηκεύονται στους 4°C για μία μέρα.

Μετά την ανάπτυξη των υγρών καλλιιεργειών μικρής κλίμακας μετασχηματισμένων κυττάρων που εκφράζουν τη χιμαιρική αροΕ3, αυτές θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη καλλιιεργειών μεγάλης κλίμακας. Ειδικότερα, την επόμενη μέρα επιλέγεται μία από τις καλλιιεργειες μικρής κλίμακας, η οποία φυγοκεντρείται στα 6.200 x g για 10min στους 4°C. Γίνεται απόχυση του θρεπτικού υλικού, υπό στείρες συνθήκες, και επαναιώρηση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων σε 10mL θρεπτικού υλικού LB με αμπικικιλίνη (100μg/mL). Χρησιμοποιούνται 5mL από την καλλιιεργεια αυτή, υπό στείρες συνθήκες, για τον εμβολιασμό 500mL LB με αμπικικιλίνη (100μg/mL) (καλλιιεργεια μεγάλης κλίμακας), το οποίο περιέχεται σε καθεμία απο τις δύο κωνικές φιάλες όγκου 2L. Οι καλλιιεργειες επωάζονται στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο με ανακίνηση στα 220rpm, μέχρι η οπτική τους πυκνότητα στα 600nm να φτάσει το 0,6. Μετά από ~2,5h επώασης, λαμβάνονται δείγματα από τις καλλιιεργειες ανά τακτά διαστήματα, υπό στείρες συνθήκες, και μετράται η απορρόφηση του αιωρήματος των βακτηρίων στα 600nm, ώστε να μην ξεπεραστεί το όριο απορρόφησης 0,6. Όταν η απορρόφηση σε κάθε καλλιιεργεια φθάσει την επιθυμητή τιμή (OD~0,6) (συνήθως μετά από 4h), προστίθεται διάλυμα IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και ακολουθεί επώαση για 2h στους 37°C στα 220rpm προς επαγωγή της έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx- αροΕ3. Η επώαση με το IPTG επάγει την έκφραση αρχικά της πολυμεράσης του βακτηριοφάγου T7 από τα βακτηριακά κύτταρα BL21-Gold (DE3) των καλλιιεργειών, η οποία οδηγεί σε μεταγραφή του γονιδίου της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx- αροΕ3 σε υψηλούς ρυθμούς, με αποτέλεσμα την έκφρασή της. Μετά από 2h, οι καλλιιεργειες μεταφέρονται σε ειδικά δοχεία φυγοκέντρου και φυγοκεντρούνται στα 4.500rpm για 20min στους 4°C. Γίνεται απόχυση του υπερκειμένου και τα ίζηματα των κυττάρων αποθηκεύονται στους -80°C.

Πριν και μετά την επαγωγή έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3, λαμβάνεται δείγμα του 1mL από κάθε καλλιιεργεια, το οποίο φυγοκεντρείται στα 9.000rpm για 10min στους 4°C, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε 200μL ddH₂O και φυλάσσεται στους -20°C. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε

πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. Ενότητα 3.13.1) και ελέγχεται η επιτυχία έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx- αρoE3.

3.3.Απομόνωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-αρoE3 από τα κύτταρα έκφρασης BL21-Gold (DE3)

Υλικά: Ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl (Applichem), pH 8.0, 0.5M NaCl (Applichem) (φιλτράρεται με 0.2μM φίλτρο και αποθηκεύεται στους 4°C), μίγμα αναστολέων πρωτεασών χωρίς EDTA (complete ULTRA tablets EDTA-free, protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich) σε ταμπλέτα ενεργότητας 5X, ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων (50ml) που περιέχει: 1) διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 2) λυσοζύμη 0.1mg/ml (Applichem), 3) β-μερκαπτοαιθανόλη 1mM (Applichem) και 4) 1 δισκίο μίγματος αναστολέων πρωτεασών χωρίς EDTA (Roche), συσκευή λύσης κυττάρων French Press (SLM-AMINCO, USA), ψυχόμενη φυγόκεντρος 2800 KUBOTA, ψυχόμενη φυγόκεντρος RC5C Plus Sorvall (SS34 κεφαλή). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.2.

Τα ίζηματα των βακτηριακών κυττάρων που έχουν υπερεκφράσει τη χιμαιρική πρωτεΐνη Trx-αρoE3 μεταφέρονται από τους -80°C στον πάγο και αφήνονται να ξεπαγώσουν αργά. Το ίζημα που προέρχεται από κάθε μία από τις δύο καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (500ml) (βλ. Ενότητα 3.2.2) αναδιασπείρεται σε 20mL κρούου διαλύματος λύσης (βλ. Υλικά Ενότητας 3.3) στους 4°C. Ακολουθεί ένωση των εναιωρημάτων των κυττάρων από τις δύο καλλιέργειες και το συνολικό βακτηριακό εναιώρημα υφίσταται λύση στο όργανο French Press υπό εφαρμογή πίεσης 600psi για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών. Το λύμα των κυττάρων συλλέγεται σε σωληνάριου τύπου falcon (των 50mL) στους 4°C. Η διαδικασία λύσης επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά. Λαμβάνονται 60μL από το τελικό κυτταρικό λύμα και αποθηκεύονται στους -20°C. Στη συνέχεια, το λύμα των κυττάρων φυγοκεντρείται σε 12.000 rpm για 2h στους 4°C. Το υπερκείμενο του λύματος (~40mL), το οποίο περιέχει το κλάσμα της διαλυτής χιμαιρικής Trx-αρoE3, αποχύνεται σε νέα δοχεία τύπου falcon και φυλλάσσεται προσωρινά στους 4°C. Το ίζημα του λύματος, το οποίο περιέχει το κλάσμα της αδιάλυτης πρωτεΐνης (inclusion bodies), αναδιαλύεται σε 4mL ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl στους 4°C και αποθηκεύεται στους -20°C. Λαμβάνονται δείγματα 60μL από το υπερκείμενο και το αναδιαλυμένο ίζημα του λύματος και αποθηκεύονται στους -20°C. Τα δείγματα του λύματος και του κλάσματος της διαλυτής και αδιάλυτης πρωτεΐνης αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%

(v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες και παρακολουθείται η έκβαση της απομόνωσης της χημεικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3.

3.4. Καθαρισμός της χημεικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης Ni-NTA

Υλικά: Αιώρημα ρητίνης νικελίου-νιτριλοτριοξεικού οξέος (Ni-NTA) σε 1:1 (v/v) 50% αιθανόλη (ThermoFischer Scientific, αποθηκεύεται στους 4°C), ιμιδαζόλιο (Fluka), ρυθμιστικά διαλύματα (φιλτράρονται με 0.2μM φίλτρο και αποθηκεύονται στους 4°C): 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl με ιμιδαζόλιο 5mM, 10mM, 20mM, 300mM, 500mM και 1M, χρωματογραφική στήλη όγκου πλήρωσης 30mL, μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους μεγέθους μικρότερου από 12-14kDa (MWCO 12-14kDa) (Sigma-Aldrich, 0,3mL/cm), ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus, Labofuge 400R, ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus, Biofuge Fresco, αναδευτήρας (shaker machine, Labnet International). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.2.

3.4.1. Εξισορρόπηση του πληρωτικού υλικού ρητίνης Ni-NTA με 5mM ιμιδαζόλιο

Ο καθαρισμός της χημεικής Trx-αροΕ3 γίνεται μέσω χρήσης ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο. Η πειραματική διαδικασία εξισορρόπησης της ρητίνης Ni-NTA με 5mM ιμιδαζόλιο είναι η εξής: Το πληρωτικό υλικό ρητίνης Ni-NTA διαλυμένο 1:1 (v/v) σε 50% αιθανόλη (~8-11mL) φυγοκεντρείται στα 1.500 x g για 5min στους 4°C για την απομάκρυνση του διαλύματος αιθανόλης. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται με προσοχή και προστίθεται πενταπλάσιος όγκος (20-27mL) ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, με 5mM ιμιδαζόλιο. Ακολουθεί επώαση για 10min στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση, και φυγοκέντρηση στα 1.500 x g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και η διαδικασία έκπλυσης και εξισορρόπησης της ρητίνης Ni-NTA με το διάλυμα πρόσδεσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 5mM ιμιδαζολίου επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Στο τελικό στάδιο, το ίζημα (~4-5,5mL) του πληρωτικού υλικού ρητίνης εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο αναδιαλύεται σε ίσο όγκο διαλύματος πρόσδεσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 5mM ιμιδαζολίου και φυλάσσεται στους 4°C.

3.4.2. Καθαρισμός της χμαιορικής Trx-αροΕ3 με στήλη συγγένειας ρητίνης Ni-NTA

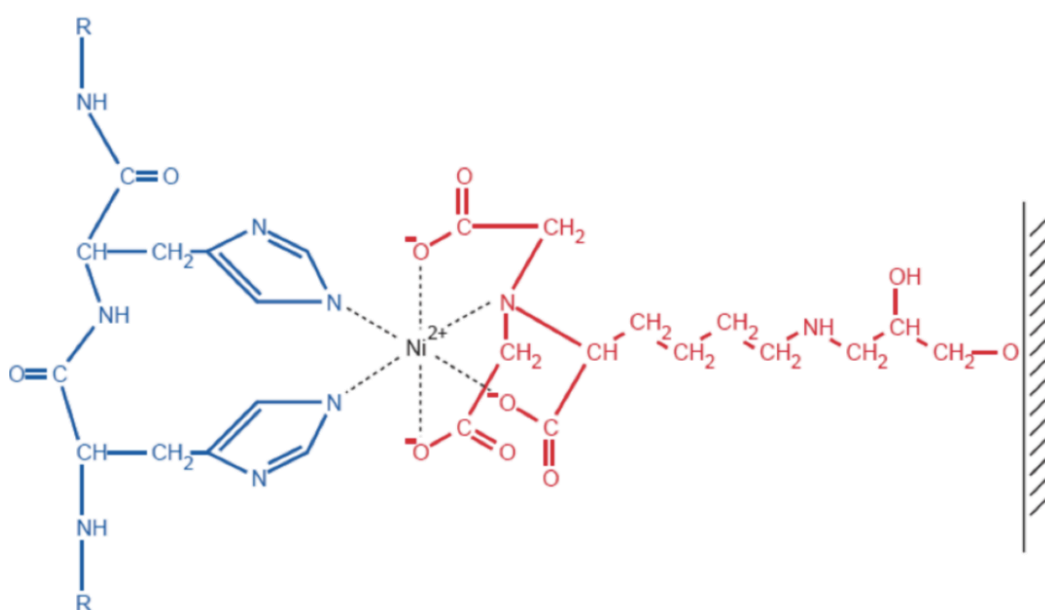
Ο καθαρισμός της χμαιορικής Trx-αροΕ3 που απομονώθηκε από τα μετασχηματισμένα βακτήρια πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με εγκαθιδρυμένη μέθοδο του εργαστηρίου της Δρ. Χρόνη Αγγελικής, Ερευνήτριας Α' στο Ινστιτούτο Βιοεπισημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» [462, 463]. Στο διαλυτό κλάσμα της χμαιορικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 το οποίο συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση του λύματος των βακτηριακών κυττάρων που έχουν εκφράσει την πρωτεΐνη (περίπου 40mL) (βλ. Ενότητα 3.3) προστίθεται διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 1M ιμιδαζολίου έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ιμιδαζολίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα να είναι 5mM. Στην συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα επωάζεται με 4mL ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο (διαλυμένης 1:1 (v/v) στο διάλυμα πρόσδεσης, άρα 8mL συνολικά, βλ. Ενότητα 3.4.1) για 14-16h στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση, ώστε τα πρωτεϊνικά μόρια να προσδεθούν στη ρητίνη. Η χμαιορική αροΕ3 περιλαμβάνει μία αλληλουχία έξι καταλοίπων ιστιδίνης (6 x His-tag) (Εικόνα 1) και σε αλκαλικό περιβάλλον προσδέεται με υψηλή συγγένεια στη στήλη Ni-NTA. Αναλυτικότερα, στο αλκαλικό περιβάλλον τα κατάλοιπα ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά και η κάθε ιστιδίνη της 6 x His-tagged πρωτεΐνης συνδέεται μέσω του ιμιδαζολικού της δακτυλίου με δύο περιοχές πρόσδεσης των ιόντων νικελίου Ni²⁺, καθώς οι άλλες τέσσερις περιοχές πρόσδεσης των Ni²⁺ είναι κατειλημένες από τις καρβοξυλικές ομάδες του νιτριλοτριοξεικού οξέος (NTA). Το Ni-NTA είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε ρητίνη αγαρόζης και συγκεκριμένα το Ni²⁺ αλληλεπιδρά με το NTA που είναι ακινητοποιημένο πάνω σε σφαιρίδια αγαρόζης (Εικόνα 3.2) [464]. Η έκλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο δομικά μοιάζει με την ιστιδίνη, δρώντας ως ανταγωνιστής της για πρόσδεση στο νικέλιο σχηματίζοντας ισχυρότερους δεσμούς με αυτό.

Την επόμενη μέρα, το αιώρημα Ni-NTA-πρωτεϊνικού διαλύματος μεταφέρεται εντός άδειας στήλης χρωματογραφίας. Το εκλουόμενο διάλυμα που διέρχεται από τη στήλη με αργή ροή (~1 σταγόνα/sec) και δε συγκρατείται στο πληρωτικό της υλικό Ni-NTA συλλέγεται στους 4°C εντός σωληνάριου τύπου falcon (των 50 mL). Το εκλουόμενο διάλυμα διέρχεται από τη στήλη άλλη μία φορά και συλλέγεται στους 4°C. Το τελικό εκλουόμενο διάλυμα (flow-through), το οποίο περιέχει μόρια που δεν προσδέθηκαν στη ρητίνη Ni-NTA της στήλης λόγω απουσίας συγγένειας, φυλάσσεται στους 4°C αφού γίνει λήψη δείγματος 60μL (αποθήκευση στους -20°C). Ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA στη στήλη με ρυθμιστικά διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου, ώστε αρχικά να επιτευχθεί η απομάκρυνση των καθόλου ή ελαφρά συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών

λόγω παρουσίας ιστιδίνης και τελικά να εκλουστεί μόνο η καθαρή χιμαιρική πρωτεΐνη Trx-αροΕ3. Επιλέγεται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου για την έκλυση της προσδεδεμένης στη ρητίνη Ni-NTA πρωτεΐνης λόγω της δομικής ομοιότητας του ιμιδαζολίου με την ιστιδίνη, αφού αποτελεί τμήμα της πλευρικής αλυσίδας της. Καθώς το πληρωτικό υλικό Ni-NTA της στήλης εκπλένεται με το διάλυμα του ιμιδαζολίου, επιτυγχάνεται η αντικατάσταση της προσδεδεμένης στο Ni-NTA 6 His-tagged χιμαιρικής αροΕ3 με μόρια ιμιδαζολίου και συνεπώς η απελευθέρωση και έκλυση της πρωτεΐνης. Αρχικά, γίνεται έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA με 45x όγκους στήλης (180mL) ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 10mM ιμιδαζολίου. Το διάλυμα έκπλυσης που διέρχεται από τη στήλη με αργή ροή συλλέγεται στους 4°C, όπου και φυλλάσσεται. Ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA με 50x όγκους στήλης (200mL) διαλύματος πλύσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 20mM ιμιδαζολίου και συλλογή του εκλουόμενου διαλύματος στους 4°C, όπου και φυλλάσσεται. Από τα εκλουόμενα διαλύματα που συλλέχθηκαν μετά από έκπλυση με τα διαλύματα πλύσης 10mM και 20mM ιμιδαζολίου λαμβάνεται δείγμα 60μL που αποθηκεύεται στους -20°C. Η έκλυση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 από τη ρητίνη Ni-NTA πραγματοποιείται με 10x όγκους στήλης (40mL) διαλύματος έκλυσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 300mM ιμιδαζολίου που διέρχονται από τη στήλη. Το εκλουόμενο διάλυμα συλλέγεται σε 8 κλάσματα των 5mL στους 4°C, όπου και φυλλάσσονται. Ακολουθεί έκλυση της καθαρής χιμαιρικής πρωτεΐνης με 5x όγκους στήλης (20mL) διαλύματος έκλυσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 500mM ιμιδαζολίου που διέρχονται από τη ρητίνη Ni-NTA της στήλης. Το εκλουόμενο διάλυμα συλλέγεται σε 4 κλάσματα των 5mL στους 4°C, όπου και φυλλάσσονται. Από κάθε ένα από τα δώδεκα κλάσματα έκλυσης λαμβάνεται δείγμα 60μL και αποθηκεύεται στους -20°C. Τέλος, γίνεται έκλυση της προσδεδεμένης στη ρητίνη Ni-NTA Trx-αροΕ3 με 4mL ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 1M ιμιδαζολίου που διέρχονται από τη στήλη. Το εκλουόμενο διάλυμα συλλέγεται στους 4°C, όπου και φυλλάσσεται. Λαμβάνεται δείγμα 60μL και αποθηκεύεται στους -20°C.

Τα δείγματα του καθαρισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx- αροΕ3: 1) εκλουόμενο διάλυμα που δεν προσδέθηκε στη ρητίνη Ni-NTA της στήλης (flow-through), 2) εκλουόμενο διάλυμα μετά από έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA της στήλης με διάλυμα 10mM ή 20mM ιμιδαζολίου, 3) κλάσματα έκλυσης με διάλυμα 300mM ή 500mM ιμιδαζολίου και 4) εκλουόμενο πρωτεϊνικό διάλυμα μετά από έκλυση με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες και παρακολουθείται η έκβαση του καθαρισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx- αροΕ3.

Τα κλάσματα έκλυσης που περιέχουν την καθαρή χιμαιρική πρωτεΐνη Trx- αροΕ3, όπως διαπιστώνεται έπειτα από ανάλυσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12% v/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες, συλλέγονται μαζί και μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης με μέγεθος πόρων που να επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από 12-14kDa (με MWCO 12-14kDa). Το μοριακό βάρος της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 είναι ~52kDa. Ακολουθεί διαπίδυση του πρωτεϊνικού διαλύματος έναντι 1L ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl για όλη τη νύχτα (~16h), υπό ανάδευση, στους 4°C. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα διαπίδυσης αντικαθίσταται με φρέσκο και η διαπίδυση διεξάγεται για ~6h, υπό ανάδευση, στους 4°C. Ακολουθεί άλλη μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης και η διαπίδυση διεξάγεται όλη τη νύχτα (~16h), υπό ανάδευση, στους 4°C. Μέσω των διαπιδύσεων απομακρύνεται το ιμιδαζόλιο που περιέχεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα της χιμαιρικής Trx-αροΕ3. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, λαμβάνεται δείγμα 60mL από την καθαρή χιμαιρική Trx-αροΕ3 και αποθηκεύεται στους -20°C, και η πρωτεΐνη φυλλάσσεται στους 4°C.



Εικόνα 3.2: Δομή του συμπλόκου καταλοίπων ιστοιδίνης της πρωτεΐνης και του Ni-NTA ακινητοποιημένου σε σφαιρίδια αραρόζης που σχηματίζεται στη χρωματογραφία συγγένειας [464].

3.5. Αντίδραση αποκοπής της ετικέτας «Trx-6 His» από τη χιμαιρική πρωτεΐνη Trx-aroE3 μέσω της His-3C πρωτεάσης

Υλικά: Διάλυμα His-3C πρωτεάσης ενεργότητας 1/80 His-3C πρωτεάσης:Trx-aroE3 (w/w), DTT (Applichem), διάλυμα DTT 1M σε ddH₂O. Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.2.

Όπως προαναφέρθηκε (Ενότητα 3.2.1, Εικόνα 3.1), η χιμαιρική αροE3 που εκφράζεται από τον φορέα pET32a-E3wt/3C μέσω του συστήματος βακτηριακής έκφρασης, φέρει την αμινοξική αλληλουχία της Trx που συνδέεται με την ετικέτα των 6 ιστιδινών (6 His) της αροE3. Επιπλέον, περιλαμβάνει την πεπτιδική αλληλουχία «NH₂-Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro-COOH» ανοδικά της αλληλουχίας αροE3 και καθοδικά της ετικέτας Trx-6 His (Εικόνα 3.1). Η His-3C πρωτεάση αγνωρίζει τη συγκεκριμένη αλληλουχία και υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ της γλουταμίνης (Gln) και της γλυκίνης (Gly). Η αντίδραση πέψης της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-aroE3 (~52kDa) με την His-3C πρωτεάση οδηγεί στην παραγωγή μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ~18kDa που περιλαμβάνει την αμινοξική αλληλουχία της Trx, την ετικέτα 6 ιστιδινών, την περιοχή πέψης από τη θρομβίνη και καταλήγει στην αλληλουχία Leu-Glu-ValLeu-Phe-Gln. Επιπλέον, από την αντίδραση πέψης παράγεται η αλληλουχία της αροE3 (34kDa), το οποίο είναι και το επιθυμητό προϊόν [462, 463].

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για την προετοιμασία της αντίδρασης πέψης είναι η εξής: Στο δείγμα της χιμαιρικής Trx-aroE3 προστίθεται η His-3C πρωτεάση (βλ. Ενότητα 3.7 και 3.8) σε αναλογία εύρους 1:80-1:120 (w/w) His-3C πρωτεάσης:Trx-aroE3. Προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα της His-3C πρωτεάσης που απαιτείται για την πέψη της συνολικής ποσότητας της χιμαιρικής Trx-aroE3, προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά τα mg της χιμαιρικής πρωτεΐνης στα 280nm με τη δοκιμασία Bradford (Ενότητα 3.12.4). Στην αντίδραση πέψης προστίθεται DTT σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η αντίδραση πέψης διεξάγεται στους 4°C για 16-18h για την πλήρη αποκοπή της ετικέτας Trx-6 His από την αροE3.

3.6. Απομόνωση της 34kDa αροE3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με στήλη ρητίνης Ni-NTA

Υλικά: Ουρία (Applichem), αιώρημα ρητίνης Ni-NTA σε 1:1 (v/v) 50% αιθανόλη (ThermoFischer Scientific, αποθηκεύεται στους 4°C), χρωματογραφική στήλη όγκου πλήρωσης 30mL, διάλυμα έκλουσης (φιλτράρεται με 0.2μM φίλτρο και αποθηκεύεται στους 4°C): 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0.5M NaCl, 1M ιμιδαζολίου, όξινο ανθρακικό αμμώνιο

(NH₄HCO₃, Sigma-Aldrich), διάλυμα NH₄HCO₃ 1M (φιλτράρεται με 0.2μM φίλτρο και αποθηκεύεται στους 4°C), διάλυμα NH₄HCO₃ 5mM, διάλυμα DTT 1M σε ddH₂O, μεμβράνη διαπίδωσης με MWCO 12-14kDa (Sigma-Aldrich, 0,3mL/cm), ψυχόμενη φυγόκεντρος 2800 KUBOTA, ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus, Labofuge 400R, ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus, Biofuge Fresco, αναδευτήρας (shaker machine, Labnet International), λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ. Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.2.

3.6.1. Εξισορρόπηση του πληρωτικού υλικού ρητίνης Ni-NTA με 5mM ιμιδαζόλιο

Η πειραματική διαδικασία για την έκπλυση και εξισορρόπηση του πληρωτικού υλικού ρητίνης Ni-NTA με διάλυμα πρόσδεσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 5mM ιμιδαζολίου που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της 34kDa αροΕ3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης, περιγράφεται στην Ενότητα 3.4.1.

3.6.2. Καθαρισμός της 34kDa αροΕ3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης με στήλη συγγένειας Ni-NTA

Ο καθαρισμός της αροΕ3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με εγκαθιδρυμένη μέθοδο του εργαστηρίου της Δρ. Χρόνη Αγγελικής, Ερευνήτριας Α' στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» [462, 463]. Μετά την ολοκλήρωση της ενζυμικής αντίδρασης αποκοπής της ετικέτας «Trx-6 His» από την χιμαιρική αροΕ3, λαμβάνεται δείγμα 60μL από το διάλυμα της αντίδρασης πέψης και αποθηκεύεται τους -20°C. Στο διάλυμα της αντίδρασης προστίθεται ουρία σε τελική συγκέντρωση 6M, ως αποδιατακτικός παράγοντας, και DTT σε τελική συγκέντρωση 1mM. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h για αποδιάταξη τυχόν συμπλεγμάτων μεταξύ της αροΕ3 (34kDa), της αποκομμένης ετικέτας Trx-6 His (18kDa) και τυχόν υπάρχουσας χιμαιρικής Trx-αροΕ3 (52kDa) που δεν έχει πεφθεί από την His-3C πρωτεάση. Μετά από 1h, η αροΕ3 απομονώνεται από το διάλυμα των προϊόντων της αντίδρασης καθώς διέρχεται μέσω στήλης ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο, ενώ τα υπόλοιπα προϊόντα της αντίδρασης πέψης κατακρατούνται από το πληρωτικό υλικό της στήλης λόγω παρουσίας ιστιδίνης. Ειδικότερα, στο διάλυμα της αντίδρασης πέψης προστίθεται 1mL ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο (που έχει εκπλυθεί και εξισορροπηθεί με διάλυμα πρόσδεσης 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 5mM ιμιδαζολίου) για κάθε 4mg χιμαιρικής Trx-αροΕ3. Η συνολική ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης σε κάθε παραγωγή ήταν περίπου 23-25 mg και ο καθαρισμός της 34kDa αροΕ3

έλαβε χώρα με σταδιακή προσθήκη 5.5mL ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο (διαλυμένης 1:1 (v/v) στο διάλυμα πρόσδεσης, άρα 11mL συνολικά, βλ. Ενότητα 3.6.1). Αναλυτικότερα, η πειραματική πορεία καθαρισμού που ακολουθείται είναι εξής: Αρχικά προστίθενται 2,5mL ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο (διαλυμένης 1:1 (v/v) στο διάλυμα πρόσδεσης, άρα 5mL συνολικά) στο διάλυμα της αντίδρασης πέψης. Ακολουθεί επώαση για 1h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και, κατόπιν, επώαση για 1h στους 4°C, υπό ήπια περιστροφική ανάδευση. Κατά τη διάρκεια των επωάσεων γίνεται πρόσδεση της His-3C πρωτεάσης, της ετικέτας Trx-6 His και τυχόν άκοπης χμαιορικής Trx-αροE3 στη ρητίνη Ni-NTA λόγω παρουσίας ιστιδίνης. Μετά από 2h, το διάλυμα της αντίδρασης με τη ρητίνη Ni-NTA μεταφέρεται σε άδεια χρωματογραφική στήλη και συλλέγεται το εκλουόμενο διάλυμα με αργή ροή στους 4°C. Το εκλουθέν διάλυμα διέρχεται από τη στήλη ακόμη μία φορά και συλλέγεται στους 4°C (Flow through 1-FT1). Ακολουθεί εκ νέου προσθήκη 1,75mL ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο (διαλυμένης 1:1 (v/v) στο διάλυμα πρόσδεσης, άρα 3,5mL συνολικά) στο FT1 και λαμβάνει χώρα επώαση για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η οποία ακολουθείται από επώαση για 30min στους 4°C, υπό περιστροφική ανάδευση. Κατόπιν, το διάλυμα FT1 με τη ρητίνη Ni-NTA διέρχεται από τη στήλη δύο φορές και το εκλουθέν διάλυμα συλλέγεται, υπό αργή ροή, στους 4°C (FT2). Στο FT2 προστίθεται 0,75mL ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο (διαλυμένης 1:1 (v/v) στο διάλυμα πρόσδεσης, άρα 1,5mL συνολικά) και ακολουθεί επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό περιστροφική ανάδευση. Έπειτα το FT2 με τη ρητίνη Ni-NTA διέρχεται από τη στήλη δύο φορές και το εκλουθέν διάλυμα συλλέγεται, υπό αργή ροή, στους 4°C (FT3). Ακολουθεί μία τελευταία προσθήκη 0,5mL ρητίνης Ni-NTA εξισορροπημένης με 5mM ιμιδαζόλιο (διαλυμένης 1:1 (v/v) στο διάλυμα πρόσδεσης, άρα 1mL συνολικά) στο FT3 και επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό περιστροφική ανάδευση. Το FT3 με τη ρητίνη Ni-NTA διέρχεται από τη στήλη 2 φορές και το τελικό εκλουθέν διάλυμα (FT4), το οποίο περιέχει την καθαρή αροE3, συλλέγεται και φυλλάσσεται στους 4°C. Τέλος, γίνεται έκλυση των προσδεδεμένων στη ρητίνη Ni-NTA πρωτεϊνών (κυρίως η ετικέτα Trx-6 His (18kDa), η His-3C πρωτεάση (24kDa) και η τυχόν άκοπη χμαιορική Trx-αροE3 (52kDa)) με 5,5mL ρυθμιστικού διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5M NaCl, 1M ιμιδαζολίου που διέρχονται από τη στήλη. Το εκλουόμενο διάλυμα συλλέγεται στους 4°C όπου και φυλλάσσεται. Από τα εκλουόμενα δείγματα FT1, FT2, FT3, FT4 και το εκλουθέν διάλυμα μετά από έκλυση με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου λαμβάνεται δείγμα 60μL και αποθηκεύεται στους -20°C. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της καθαρής χμαιορικής Trx-αροE3 πρωτεΐνης μετά τη διαπύδιση, της αροE3 μετά

την πέψη με την His-3C πρωτεάση, των FT1, FT2, FT3, FT4 της apoE3 και του πρωτεϊνικού διαλύματος που εκλούεται με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου 12% (v/v), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης πέψης της Trx-apoE3 και του καθαρισμού της apoE3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης. Παράλληλα, ηλεκτροφορούνται πρότυπα διαλύματα BSA (αλβουμίνη ορού βόας) γνωστής ποσότητας (0.5, 1.0 και 2.0 μg) για τον υπολογισμό της ποσότητας της παραγόμενης 34kDa apoE3. Η καθαρότητα της παραχθείσας apoE3 στο FT4 προσδιορίστηκε με πυκνομετρική σάρωση του αντίστοιχου δείγματος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ.

Το διάλυμα της καθαρής apoE3 (FT4) μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης με διάμετρο πόρων μικρότερο από 12-14kDa και υφίσταται διαπίδυση έναντι 1L διαλύματος NH_4HCO_3 5mM στους 4°C, υπό ανάδευση, για όλη τη νύχτα (~16h). Την επόμενη μέρα, το διάλυμα διαπίδυσης αντικαθίσταται με φρέσκο και η διαπίδυση διεξάγεται για ~6h, υπό ανάδευση, στους 4°C. Ακολουθεί άλλη μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης και η διαπίδυση διεξάγεται όλη τη νύχτα (~16h), υπό ανάδευση, στους 4°C. Μέσω των διαπιδώσεων απομακρύνεται η ουρία που περιέχεται στο διάλυμα της apoE3 και έτσι επιτυγχάνεται η επαναδιάταξη της πρωτεΐνης. Κατόπιν, το διάλυμα της apoE3 (~ 30mL) μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου falcon και φυγοκεντρείται στα 12.000 x g στους 4°C για 15min προς απομάκρυνση τυχόν συσσωματωμάτων apoE3. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε σωληνάρια τύπου falcon και φυλλάσσεται στους 4°C. Λαμβάνεται δείγμα 60μL και αποθηκεύεται στους -20°C. Η συνολική ποσότητα (mg) της παραχθείσας apoE3 ποσοτικοποιείται μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 280nm με τη δοκιμασία lowry ή Bradford (Ενότητα 3.12.3 και 3.12.4, αντίστοιχα). Κατόπιν, το πρωτεϊνικό διάλυμα της apoE3 ισομοιράζεται σε δύο σωληνάρια τύπου falcon (των 50mL) και ψύχεται υπό κλίση στους -80°C. Τέλος, τα παγωμένα διαλύματα της apoE3 λυοφιλοποιούνται και η λυοφιλιωμένη πρωτεΐνη φυλάσσεται στους -80°C.

Η παραχθείσα apoE3 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δισκοειδών ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων τύπου HDL που περιέχουν ανθρώπινη αναδιπλωμένη apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3), όπως περιγράφεται στην Ενότητα 3.10. Τα rHDL-apoE3 σωματίδια που περιείχαν την apoE3 η οποία παράχθηκε σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης E.Coli (βλ. Ενότητες 3.2-3.6) χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, με εξαίρεση τα πειράματα των μικροσυστοιχιών (Ενότητα 3.18) και

της qRT-PCR (Ενότητα 3.20). Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν rHDL-αροΕ3 σωματίδια που περιείχαν την ανθρώπινη αροΕ3 η οποία παράχθηκε σε ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης μέσω ανασυνδυασμένου αδενοϊού (βλ. Ενότητα 3.1). Οι μορφές της αροΕ που παράγονται με τα δύο αυτά συστήματα έκφρασης έχουν παρόμοια δομή, όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες [463].

3.7. Έκφραση της His-3C πρωτεάσης σε βακτηριακό σύστημα E.Coli

Υλικά: Πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο έκφρασης της His-3C πρωτεάσης (pET-24/His-3C), καναμυκίνη (Applichem), διάλυμα καναμυκίνης 50mg/mL (stock), θρεπτικό υλικό LB-άγαρ: 4gr LB (Applichem/Q BIOgene) και 3gr άγαρ για βακτηριολογία (Sigma-Aldrich) σε 200ml dH₂O, ακολουθεί αποστείρωση και προσθήκη καναμυκίνης σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL. Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.2.

Η έκφραση της His-3C πρωτεάσης σε βακτηριακά κύτταρα E.Coli (Ενότητα 3.7) και η απομόνωσή της από αυτά (Ενότητα 3.8) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με εγκαθιδρυμένη μέθοδο του εργαστηρίου της Δρ. Χρόνη Αγγελικής, Ερευνήτριας Α' στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» [462, 463]. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-24/His-3C που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από το εργαστήριο της Δρ. Χρόνη Α. και δόθηκε γενναιόδωρα δωρεά από τον Dr. Arie Geerlof (EMBL, Heidelberg, Germany). Ειδικότερα, γίνεται μετασχηματισμός των επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.Coli BL21-Gold (DE3) (50μL) με τον πλασμιδιακό φορέα pET-24/His-3C (1μL) που φέρει την cDNA αλληλουχία έκφρασης της His-3C πρωτεάσης, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο έκφρασης της 3C πρωτεάσης συζευγμένο με μία ετικέτα 6 ιστιδινών, και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (βλ. Ενότητα 3.2.1).

Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία LB-άγαρ που περιέχουν καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50μg/mL και επωάζονται στους 37°C για 16h. Από τις αποικίες των μετασχηματισμένων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν επιλέγεται μία για τον εμβολιασμό 5mL θρεπτικού υλικού LB με καναμυκίνη (50μg/mL) (καλλιέργεια μικρής κλίμακας), το οποίο περιέχεται σε κάθε ένα από τα τρία σωληνάρια τύπου falcon (των 50mL). Παράλληλα, σε ένα άλλο σωληνάριο, μεταφέρονται 5 mL θρεπτικού υλικού LB με καναμυκίνη (50μg/mL) απουσία αποικίας που χρησιμοποιείται ως δείγμα-μάρτυρας («τυφλό»). Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C σε επωαστικό κλίβανου στα 220rpm για

16h. Την επόμενη μέρα, επιλέγεται μία από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας και φυγοκεντρείται στα 6.200 x g για 10min στους 4°C. Γίνεται απόχυση του υπερκειμένου και το ίζημα των μετασχηματισμένων βακτηρίων επαναιωρείται σε 10 mL θρεπτικού υλικού LB με καναμυκίνη (50μg/mL). Χρησιμοποιούνται 5mL από την καλλιέργεια αυτή για τον εμβολιασμό 500mL LB με καναμυκίνη (50μg/mL) (καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας), το οποίο περιέχεται σε καθεμία από τις δύο κωνικές φιάλες όγκου 2L. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο στα 220rpm, μέχρι η οπτική τους πυκνότητα στα 600nm να φτάσει το 0.6 (χρόνος επώασης ~3h). Τότε, προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5M σε κάθε μία από τις δύο καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και ακολουθεί επώαση στους 20°C σε επωαστικό κλίβανου στα 220rpm για 16h προς επαγωγή έκφρασης της His-3C πρωτεΐσης. Την επόμενη μέρα, οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται στα 4.000rpm για 20min στους 4°C. Γίνεται απόχυση του υπερκειμένου και τα ίζηματα των κυττάρων αποθηκεύονται στους -80°C.

Πριν και μετά την επαγωγή έκφρασης της His-3C πρωτεΐσης με IPTG λαμβάνεται δείγμα του 1mL από κάθε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας, το οποίο φυγοκεντρείται στα 9.000rpm για 15min στους 4 °C, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 100μL ddH₂O και αποθηκεύεται στους -20°C. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% (v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. Ενότητα 3.13.1) και ελέγχεται η επιτυχία έκφρασης της His-3C πρωτεΐσης.

3.8. Απομόνωση της His-3C πρωτεΐσης από τα κύτταρα έκφρασης BL21-Gold (DE3)

Υλικά: Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl (Applichem), pH 7.5, 0.5M NaCl (Applichem) απουσία ιμιδαζολίου ή με 20mM ιμιδαζόλιο (Fluka) (φιλτράρεται με 0.2μM φίλτρο και αποθηκεύεται στους 4°C), ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων (50ml) που περιέχει: 1) διάλυμα 50mM Tris-HCl, pH 7.5 που περιέχει 0.5M NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο, 2) 1 δισκίο μίγματος αναστολέων πρωτεασών χωρίς EDTA (Roche Life Science) και 3) 0.2% (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich), γλυκερόλη. Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στις Ενότητες 3.1 και 3.2.

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων που έχουν υπερεκφράσει την His-3C πρωτεΐση και προέρχεται από κάθε μία από τις δύο καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (500mL) αναδιασπείρεται σε 20mL διαλύματος λύσης (βλ. Υλικά Ενότητας 3.8) στους 4°C. Ακολουθεί ένωση των εναιωρημάτων των κυττάρων από τις δύο καλλιέργειες και το συνολικό βακτηριακό εναιώρημα υφίσταται λύση στο όργανο French Press υπό πίεση 600psi (βλ.

Ενότητα 3.3). Λαμβάνονται 60μL από το κυτταρικό λύμα και αποθηκεύονται στους -20°C. Το λύμα των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 12.000rpm για 2h στους 4°C. Το υπερκείμενο του λύματος (~40mL), το οποίο περιέχει το διαλυτό κλάσμα της His-3C πρωτεάσης, φυλλάσσεται προσωρινά στους 4°C. Το ίζημα του λύματος, το οποίο περιέχει το κλάσμα της αδιάλυτης πρωτεΐνης (inclusion bodies), αναδιαλύεται σε 6mL ρυθμιστικού διαλύματος 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl στους 4°C και κατόπιν αποθηκεύεται στους -20°C. Δείγματα 60μL λαμβάνονται από το υπερκείμενο και το αναδιαλυμένο ίζημα του λύματος και αποθηκεύονται στους -20°C. Τα δείγματα του λύματος και του κλάσματος της διαλυτής και αδιάλυτης πρωτεΐνης αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% (v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες και παρακολουθείται η έκβαση της απομόνωσης της His-3C πρωτεάσης.

3.9.Καθαρισμός της His-3C πρωτεάσης με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης Ni-NTA

Υλικά: Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl (Applichem), pH 7.5, 0.5M NaCl (Applichem), ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης: 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 20mM ιμιδαζόλιο (Fluka), ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης: 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl που περιέχει 300mM ή 500mM ή 1M ιμιδαζόλιο (τα ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής σύστασης σε ιμιδαζόλιο που χρησιμοποιούνται φιλτράνονται με 0.2μM φίλτρο και αποθηκεύονται στους 4°C), γλυκερόλη (Applichem), ψυχόμενη φυγόκεντρος 2800 KUBOTA. Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στις Ενότητες 3.1 και 3.3.

Ο καθαρισμός της His-3C πρωτεάσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με εγκαθιδρυμένη μέθοδο του εργαστηρίου της Δρ. Χρόνη Αγγελικής, Ερευνήτριας Α' στο Ινστιτούτο Βιοεπισημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» [462, 463]. Στο κλάσμα της διαλυτής His-3C πρωτεάσης (~40mL) που συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση του λύματος των βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη προστίθεται διάλυμα 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 1M ιμιδαζολίου έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ιμιδαζολίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα να είναι 20mM. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα επώαζεται με 2mL ρητίνης NiNTA εξισορροπημένης με 20mM ιμιδαζόλιο (διαλυμένης 1:1 (v/v) σε διάλυμα πρόσδεσης 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 20mM ιμιδαζολίου, άρα 4mL συνολικά) για 2h, υπό ήπια ανάδευση, στους 4°C, ώστε να γίνει η πρόσδεση της His-3C πρωτεάσης στη ρητίνη Ni-NTA λόγω παρουσίας ιστιδίνης. Η πειραματική διαδικασία

έκπλυσης και εξισορρόπησης της ρητίνης Ni-NTA με ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 20mM ιμιδαζολίου είναι αντίστοιχη με αυτή που περιγράφεται στην Ενότητα 3.4.1.

Μετά από 2h, το αιώρημα Ni-NTA με την προσδεσμένη His-3C πρωτεάση διέρχεται από στήλη χρωματογραφίας και το εκλούμενο διάλυμα που περιέχει τα μόρια που δεν προσδέθηκαν στη ρητίνη Ni-NTA (flow-through), κυρίως λόγω απουσίας ιστιδίνης, συλλέγεται στους 4°C. Το flow-through διάλυμα διέρχεται από τη στήλη άλλη μία φορά και το τελικό εκλούμενο διάλυμα συλλέγεται στους 4°C, όπου και αποθηκεύεται. Ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA στη στήλη με 125x όγκους στήλης (250mL) διαλύματος πλύσης 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 20mM ιμιδαζολίου. Το διάλυμα έκπλυσης που διέρχεται από τη στήλη συλλέγεται στους 4°C, όπου και φυλλάσσεται. Η έκλουση της His-3C πρωτεάσης από τη ρητίνη Ni-NTA της στήλης πραγματοποιείται με 10x όγκους στήλης (20mL) διαλύματος έκλουσης 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 300mM ιμιδαζολίου που διέρχονται από τη στήλη. Το εκλούμενο διάλυμα συλλέγεται σε 10 κλάσματα των 2mL στους 4°C, όπου και φυλλάσσονται. Ακολουθεί έκλουση της πρωτεΐνης με 2.5x όγκους στήλης (5mL) διαλύματος έκλουσης 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 500mM ιμιδαζολίου που διέρχονται από τη ρητίνη Ni-NTA της στήλης. Το εκλούμενο διάλυμα συλλέγεται σε 2 κλάσματα των 2.5mL στους 4°C, όπου και φυλλάσσονται. Τέλος, γίνεται έκλουση των προσδεσμένων στη ρητίνη Ni-NTA μορίων με 2mL ρυθμιστικού διαλύματος 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 1M ιμιδαζολίου που διέρχονται από τη στήλη. Το εκλούμενο διάλυμα συλλέγεται στους 4°C, όπου και φυλλάσσεται.

Λαμβάνεται δείγμα 60μL από το τελικό flow-through διάλυμα, το διάλυμα που εκλούστηκε μετά από έκπλυση της στήλης με διάλυμα 20mM ιμιδαζολίου, τα 12 πρωτεϊνικά κλάσματα έκλουσης με διάλυμα 300mM ή 500mM ιμιδαζολίου και το πρωτεϊνικό διάλυμα που εκλούεται με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% (v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες και παρακολουθείται η έκβαση του καθαρισμού της His-3C πρωτεάσης.

Τα κλάσματα που περιέχουν την καθαρή His-3C πρωτεάση μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης με διάμετρο πόρων μικρότερη από 12-14kDa και υφίσταται διαπίδυση έναντι 2L ρυθμιστικού διαλύματος 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl στους 4°C, υπό ανάδευση, για όλη τη νύχτα (~16h). Την επόμενη μέρα, το διάλυμα διαπίδυσης αντικαθίσταται με φρέσκο και η διαπίδυση διεξάγεται για ~6h, υπό ανάδευση, στους 4°C. Ακολουθεί άλλη μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης και η διαπίδυση διεξάγεται όλη τη νύχτα (~16h), υπό ανάδευση, στους 4°C. Μέσω των διαπιδύσεων απομακρύνεται το ιμιδαζόλιο που

περιέχεται στο διάλυμα της His-3C πρωτεάσης. Κατόπιν, το διάλυμα της His-3C πρωτεάσης φυγοκεντρείται στα 6.000rpm στους 4°C για 10min προς απομάκρυνση των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης και το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλλάσσεται στους 4°C. Λαμβάνεται δείγμα 60μL απο το υπερκείμενο και αποθηκεύεται στους -20°C. Η συνολική ποσότητα της παραχθείσας His-3C πρωτεάσης ποσοτικοποιείται μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 280nm με τη δοκιμασία Bradford (Ενότητα 3.12.4). Στο διάλυμα της His-3C πρωτεάσης προστίθεται γλυκερόλη σε περιεκτικότητα 10% (v/v) και το διάλυμα ισομοιράζεται σε κλάσματα των 0,5mL που αποθηκεύονται στους -20°C.

3.10. Παρασκευή δισκοειδών ανασυγκροτημένων σωματιδίων HDL που περιέχουν apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3)

Υλικά: Διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1X ή 10X χωρίς CaCl₂ και MgCl₂ (DPBS 1X (pH = 7-7.3), DPBS 10X (pH = 7-7.6): Thermo Fisher Scientific/Sigma-Aldrich/Lonza), υδροχλωρική γουανιδίνη, ultra pure (Applichem), διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 8M σε DPBS 1X (φιλτράρεται με φίλτρο 0.2μM), χλωροφόρμιο (Merck), μεθανόλη (Applichem) L-α φωσφατιδυλοχολίνη απομονωμένο από κρόκο αυγού (egg PC, Sigma-Aldrich), διάλυμα egg PC 20mg/mL σε χλωροφόρμιο:μεθανόλη 2:1 (v/v), χολικό νάτριο (Sigma-Aldrich), διάλυμα χολικού νατρίου 30mg/mL σε DPBS 1X, apoE3 (λυοφιλιωμένη), διάλυμα φρέσκιας αναδιπλωμένης apoE3 σε PBS 1X, διάλυμα DTT 1M σε ddH₂O, αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 1,5mL (Kisker Biotech), γυάλινα σιφώνια όγκου 1 και 2mL (Corning), γυάλινοι σωληνάρια, αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 50mL (Greiner), κυκλοαναδευτήρας (Vortex-2 Genie, Scientific Industries), μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 12-14kDa (Sigma-Aldrich), ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraecus Biofuge Pico, οβίδα αέριου αζώτου. Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.2.

3.10.1. Χημική αποδιάταξη της apoE3 παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης

Πριν την παρασκευή δισκοειδών ανασυγκροτημένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων τύπου HDL που περιέχουν ανθρώπινη apoE3 και φωσφολιπίδια (rHDL-apoE3) λαμβάνει χώρα η χημική αποδιάταξη της apoE3 παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης και η επακόλουθη επαναδιάταξή της [462, 463]. Η υδροχλωρική γουανιδίνη είναι ένας ισχυρός μετουσιωτικός παράγοντας που διασπά τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (> 6M) καταστρέφει τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης που οφείλεται σε δεσμούς υδρογόνου, γέφυρες άλατος και μη πολικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ δεν

επηρεάζει τους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Σε ένα τυπικό πείραμα ~3-4mg λυοφιλωμένης καθαρής apoE3 (βλ. Ενότητα 3.6) επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης 8M σε DPBS 1x, ώστε η τελική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος της apoE3 να είναι 1.0-1.5 mg/ml. Προστίθεται DTT στο διάλυμα της apoE3 με τελική συγκέντρωση 1mM. Η apoE3 πρέπει να βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων (διμερών, τετραμερών ή οχταμερών μεταξύ των μορίων της apoE3 λόγω παρουσίας κυστεϊνών). Η apoE3 επώαζεται στην υδροχλωρική γουανιδίνη για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξή της. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος της apoE3 στα 12.000 x g στους 4°C για 20min, συλλογή του υπερκείμενου και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του φασματοφωτομετρικά με Nano Drop στα 280nm (Ενότητα 3.11.2). Στη συνέχεια, το διάλυμα της apoE3 υφίσταται διαπίδυση έναντι 1L PBS 1X στους 4°C, υπό ανάδευση, με τη χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πόρων μικρότερη από 12-14kDa. Συγκεκριμένα, γίνονται 3 διαπιδύσεις, εκ των οποίων η μία διαρκεί ~6h και οι άλλες δύο διεξάγονται για όλη τη νύχτα (~16h). Μέσω των διαπιδύσεων απομακρύνεται η υδροχλωρική γουανιδίνη από το πρωτεϊνικό διάλυμα και τα μόρια της apoE3 ανακτούν την εγγενή διαμόρφωσή τους στο χώρο (επαναδιάταξη της apoE3). Τυχόν μόρια της apoE3 που δεν έχουν ανακτήσει τη διαμόρφωσή τους, είναι ασταθή, συσσωματώνονται, καταβυθίζονται και απομακρύνονται με τη μορφή ιζήματος μέσω φυγοκέντρησης του διαλύματος της apoE3 στα 12.000 x g στους 4°C για 20min. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει την αναδιπλωμένη apoE3 που ανέκτησε τη σωστή διαμόρφωση, συλλέγεται και αποθηκεύεται στους 4°C. Λαμβάνεται δείγμα 60μL που αποθηκεύεται στους -20°C. Ακολουθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης του διαλύματος της αναδιπλωμένης apoE3 με τη δοκιμασία Lowry (Ενότητα 3.12.3). Δείγμα της αναδιπλωμένης apoE3 αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (v/v) (Ενότητα 3.13.1), προκειμένου να ελεγχθεί η δομική ακεραιότητα και καθαρότητα της πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των σωματιδίων rHDL-apoE3 (Ενότητα 3.9.2).

3.10.2. Παρασκευή σωματιδίων rHDL-apoE3

Η παρασκευή δισκοειδών ανασυγκροτημένων HDL-apoE3 σωματιδίων γίνεται με τη μέθοδο διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες [461, 462], με μερικές μικρές τροποποιήσεις. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, δισκοειδή

λιποπρωτεϊνικά σωματίδια σχηματίζονται από την apoE3 και τα μυκήλια λιπιδίων παρουσία χολικού νατρίου. Όταν το χολικό νάτριο και τα μυκήλια φωσφολιπιδίων αναμειχθούν σε μοριακή αναλογία 1:1, τα χολικά άλατα διαταράσσουν το πλέγμα των λιπιδίων και το διαλυτοποιούν. Το μίγμα φωσφολιπιδίων-χολικού νατρίου σχηματίζει δισκοειδείς διπλοστιβάδες λιπιδίων και χολικού νατρίου που σταθεροποιούνται με τη δακτυλιοειδή τοποθέτηση μορίων χολικού νατρίου γύρω από τη διπλοστιβάδα. Κατόπιν το μίγμα επωάζεται με apoE3 σε μοριακή αναλογία 100:1 και ακολουθεί διαπίδυση. Με την απομάκρυνση του χολικού νατρίου μέσω διαπίδυσης, τα μόρια του χολικού νατρίου στα λιποσώματα σταδιακά αντικαθίστανται με μόρια apoE3 για το σχηματισμό δισκοειδών λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων τύπου HDL.

Για την παρασκευή των rHDL-apoE3 σωματιδίων χρησιμοποιούνται οι μοριακές αναλογίες 100:1:100 φωσφολιπίδια:apoE3:χολικό νάτριο. Σε ένα τυπικό πείραμα για την παρασκευή 1,7mg σωματιδίων rHDL-apoE3 η πειραματική πορεία που ακολουθείται είναι η εξής: 3,78mg φωσφολιπιδίων egg PC (από stock διάλυμα φωσφολιπιδίων κρόκου αυγού 20mg/mL σε χλωροφόρμιο:μεθανόλη 2:1 (v/v)) μεταφέρονται σε γυάλινο σωληνάριο και ξηραίνονται υπό συνεχή ροή αζώτου. Τα ξηραμένα φωσφολιπίδια επαναδυσολύνονται σε 418,2μL DPBS 1X (pH=7.0-7.3) με επαναλαμβανόμενη ήπια ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα για 30sec ακολουθούμενη από επώαση στους 4°C για 30sec. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 1h και οδηγεί στην πλήρη ομογενοποίηση των φωσφολιπιδίων και την παρασκευή ομογενούς γαλακτώματος. Ακολούθως, προστίθενται 2,12mg χολικού νατρίου (από stock διάλυμα χολικού νατρίου 30mg/mL σε DPBS 1X), το οποίο θα διαυγάσει το γαλάκτωμα των φωσφολιπιδίων, και ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 4°C για 1h. Σε περίπτωση που το μίγμα δε γίνει διαυγές μετά την προσθήκη του χολικού νατρίου προστίθεται εκ νέου χολικό νάτριο, που συνήθως αντιστοιχεί στο 50% της αρχικής ποσότητας που προστέθηκε, εντός της 1h. Κατόπιν, προστίθενται 1,7mg φρέσκιας αναδιπλωμένης apoE3 (βλ. Ενότητα 3.10.1) στο διαυγές γαλάκτωμα και το μίγμα επωάζεται στους 4°C για 1h. Ακολουθεί διαπίδυση του δείγματος έναντι 1L PBS 1X, υπό ανάδευση, στους 4°C για όλη τη νύχτα (~16h), με τη χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πορων μικρότερη από 12-14kDa. Την επόμενη μέρα γίνονται δύο αλλαγές του διαλύματος διαπίδυσης, εκ των οποίων η μία διαπίδυση διαρκεί ~6h και η τελευταία διεξάγεται όλη τη νύχτα (~16h). Μέσω των διαπιδύσεων απομάκρυνεται το χολικό νάτριο από το δείγμα. Στη συνέχεια, στα σωματίδια rHDL-apoE3 διαβιβάζεται αέριο άζωτο για να αποφευχθεί η οξειδωση των λιπιδίων και αποθηκεύονται στους 4°C. Ακολουθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο ποιοτικός έλεγχος των σωματιδίων rHDL-apoE3 (Ενότητα 3.11).

3.11. Ποσοτικός προσδιορισμός της αναλογίας apoE3:φωσφολιπίδια στα σωματίδια rHDL-apoE3 και ποιοτικός έλεγχος του σχηματισμού τους

Πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της apoE3 με τη χρωματομετρική δοκιμασία Lowry (Ενότητα 3.11.3) και των φωσφολιπιδίων με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο (Ενότητα 3.12.5) στα σωματίδια rHDL-apoE3, προκειμένου να υπολογιστεί η μοριακή αναλογία φωσφολιπίδια:apoE3 σε αυτά, η οποία θα πρέπει να είναι 100:1. Οι συγκεντρώσεις των σωματιδίων rHDL-apoE3 που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπολογίστηκαν με βάση την περιεχόμενη ποσότητα της apoE3. Ο επιτυχής σχηματισμός των σωματιδίων rHDL-apoE3 ελέγχεται ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση δείγματος rHDL-apoE3 (5μg, 7,5μg ή 10μg) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% (v/v) ή διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες στους 4°C, με τη χρήση πρωτεϊνικών δεικτών υψηλής μοριακής μάζας με γνωστά μοριακά βάρη και γνωστές υδροδυναμικές διαμέτρους (Ενότητα 3.13.2). Παράλληλα ηλεκτροφορείται και δείγμα ελεύθερης λιπιδίων αναδιπλωμένης apoE3 (5μg, 7,5μg ή 10μg) (Ενότητα 3.10.1) (Ενότητα 3.13.2). Με τον τρόπο αυτό παρέχεται η δυνατότητα ελέγχου του επιτυχούς σχηματισμού των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων rHDL-apoE3, καθώς λόγω της σύνδεσης της apoE3 με τα λιποσώματα, τα σωματίδια έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την ελεύθερη λιπιδίων απολιποπρωτεΐνη. Επιπροσθέτως, διαπιστώνεται αν έχει δεσμευτεί όλη η apoE3 στα λιποσώματα ή αν τα σωματίδια rHDL-apoE3 περιέχουν ελεύθερη λιπιδίων apoE3 σε μικρό ποσοστό. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση των σωματιδίων rHDL-apoE3 σε μη αποδιατακτικές συνθήκες παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης των υποπληθυσμών τους με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο (Ενότητα 3.13.2).

3.12. Ποσοτικοποίηση συστατικών διαλύματος

3.12.1. Μέτρηση απορρόφησης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Υλικά: Φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer (USA) Lambda 35 UV/VIS, ζεύγος κυψελίδων Quartz (Fisher Scientific), πλαστικές κυψελίδες πολυστυρενίου (Greiner Bio-one), πιπέτες όγκου έως 1000μL (Eppendorf), αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών (Sarstedt), ηλεκτρικός πιπεταδόρος αυτόματης αναρρόφησης και εκροής (Eppendorf), αποστειρωμένα σιφώνια όγκου 2mL (Sarstedt).

Το φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (βλ. Υλικά Ενότητας 3.12.1) περιλαμβάνει δύο ξεχωριστές θέσεις τοποθέτησης των κυψελίδων. Στη μία θέση τοποθετείται η κυψελίδα με

το διάλυμα του οποίου η απορρόφηση ορίζεται ως μηδέν και ως προς το οποίο διορθώνεται η απορρόφηση του δείγματος. Αρχικά, εντός του ζεύγους των κυψελίδων Quartz τοποθετούνται από 300μL του διαλύματος που αποτελεί το διαλύτη των πρωτεϊνικών διαλυμάτων που θα ποσοτικοποιηθούν (διάλυμα αναφοράς-«τυφλό»). Ορίζεται μηδενική η διαφορά της απορρόφησης των δύο διαλυμάτων. Ακολούθως, αφήνοντας την κυψελίδα με το διάλυμα μηδενικής απορρόφησης στη θέση που διέρχεται η δέσμη αναφοράς, τοποθετείται στην άλλη υποδοχή, η δεύτερη κυψελίδα, στην οποία πλέον έχει εισαχθεί το πρωτεϊνικό διάλυμα προς ποσοτικοποίηση (300μL). Μετράται η απορρόφηση του δείγματος που αντιστοιχεί στη διαφορά της απορρόφησης μεταξύ του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς. Η απορρόφηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων μετράται στα 280nm και αντιστοιχεί στην απορρόφηση των αμινοξέων θρυπτοφάνης και τυροσίνης που περιλαμβάνονται στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος υπολογίζεται με τη χρήση του νόμου Beer-Lambert (βλ. Ενότητα 3.12.2). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της αρoE3 αγρίου τύπου είναι 1.287 mL mg⁻¹ cm⁻¹. Στην περίπτωση των καλλιεργειών μετασχηματισμένων βακτηρίων που εκφράζουν τη χιμαιρική Trx-αρoE3 ή την His-3C πρωτεάση (βλ. Ενότητα 3.2.2 και 3.7), εντός πλαστικής κυψελίδας τοποθετείται 1mL βακτηριακής καλλιέργειας και μετράται η απορρόφηση στα 600nm στο φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης. Ως διάλυμα αναφοράς χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό LB (1mL), του οποίου η απορρόφηση ορίζεται ως μηδέν.

3.12.2. Μέτρηση απορρόφησης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nano-Drop

Υλικά: Φασματοφωτόμετρο Nano Drop ND-1000, πιπέτες όγκου έως 2μL (Eppendorf), αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών (Sarstedt).

Στο φασματοφωτόμετρο Nano Drop ND-1000 ορίζεται ως μηδενική απορρόφηση αυτή που μετράται όταν στη θέση τοποθέτησης του δείγματος φορτώνεται 1μL από το διαλύτη του πρωτεϊνικού δείγματος που θα ποσοτικοποιηθεί (διάλυμα αναφοράς). Ακολούθως, στη θέση αυτή τοποθετείται 1μL του πρωτεϊνικού δείγματος προς ποσοτικοποίηση και λαμβάνεται φάσμα από τα 220-340nm. Από την καμπύλη απορρόφησης που προκύπτει καταγράφονται οι τιμές απορρόφησης A260, A280 και A320. Η απορρόφηση στα 280nm αντιστοιχεί στην απορρόφηση των αμινοξέων θρυπτοφάνης και τυροσίνης του πρωτεϊνικού δείγματος που σκεδάζουν το φως. Από την τιμή A280 αφαιρείται η τιμή A320, η οποία αντιστοιχεί στην απορρόφηση τυχόν πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων του δείγματος. Η

συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος υπολογίζεται με τη χρήση του νόμου Beer-Lambert: $A = \epsilon \times l \times C$, όπου A: η απορρόφηση στα 280nm από την οποία αφαιρείται η τιμή A320, ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($\text{mL} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), l: το μήκος της οπτικής διαδρομής (cm) και C: η συγκέντρωση του διαλύματος mg/mL. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης στα 280nm για την αρθρική αργίου τύπου είναι $1.287 \text{ mL} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Η καθαρότητα του πρωτεϊνικού δείγματος από προσμίξεις DNA προσδιορίζεται από το λόγο A260/A280 (σε καθαρά δείγματα πρωτεϊνών $A260/A280 \approx 0.6$).

3.12.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Lowry

Υλικά: Kit προσδιορισμού πρωτεϊνών DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) που περιέχει: 1) 250mL αντιδραστήριο A (αλκαλικό διάλυμα χαλκού), 2) 2L αντιδραστηρίου B (αραιό αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu), 3) 5mL, αντιδραστηρίου S (επιφανειοδραστικός παράγοντας), πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης ορού βοός (BSA) αυξανόμενης συγκέντρωσης σε DPBS 1X: 0.125mg/mL, 0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 1mg/mL και 2mg/mL (παρασκευάζονται από stock διάλυμα συγκέντρωσης 2mg/mL (Pierce/ThermoFisher Scientific)), PBS 1X (Thermo Fisher Scientific/Sigma-Aldrich), πιάτο 96 θέσεων (Greiner Bio-one), μετρητής πλακιδίων απορρόφησης-φθορισμού (TECAN Infinite M200), πιπέτες όγκου έως 10μL, 20μL, 200μL και 1000μL (Eppendorf), αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών (Sarstedt), αποστειρωμένα σιφώνια όγκου 2mL, 5mL, 10mL, 25mL (Sarstedt), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 15mL (Greiner), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου eppendorf όγκου 1,5mL (Kisker Biotech). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του δείγματος με τη χρωματομετρική δοκιμασία Lowry βασίζεται στο γεγονός ότι κατιόντα δισθενούς χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον (αντιδραστήριο A) σχηματίζουν σύμπλοκα ιώδους χρώματος με τους πεπτιδικούς δεσμούς και ανάγονται σε κατιόντα μονοθενούς χαλκού. Στη συνέχεια, με την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (B) γίνεται αναγωγή των μολυβδαινικών και βολφραμικών ιόντων που περιέχονται σε αυτό, με αποτέλεσμα το σχηματισμό προϊόντος που έχει έντονο μπλε χρώμα. Κατά την αναγωγή των παραπάνω ιόντων οξειδώνονται κυρίως τα αμινοξέα τυροσίνη και θρυπτοφάνη και σε μικρότερο βαθμό η ιστιδίνη και η κυστεΐνη. Το μέγιστο της απορρόφησης είναι στα 750nm και το ελάχιστο στα 405nm.

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται στη δοκιμασία Lowry είναι η εξής: Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα «A+S», έπειτα από προσθήκη 20μL αντιδραστηρίου S σε 1000μL αντιδραστηρίου A. Γίνεται ανάμιξη 5μL προτύπων διαλυμάτων BSA (0.125mg/mL, 0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL) ή 5μL πρωτεϊνικού δείγματος ή 5μL «τυφλού» με

25μL διαλύματος «A+S» και έπειτα με 200μL αντιδραστηρίου B σε κάθε οπή του πιάτου 96 θέσεων. Σαν «τυφλό» χρησιμοποιείται ο διαλύτης των πρωτεϊνικών δειγμάτων που θα ποσοτικοποιηθούν (διάλυμα αναφοράς). Στην περίπτωση των δειγμάτων αρoE3 ή rHDL-αρoE3 είναι το DPBS 1X. Τα πρότυπα διαλύματα BSA παρασκευάζονται με διαλύτη το DPBS 1X που χρησιμοποιείται ως «τυφλό» για τα αυτά. Ακολουθεί επώαση του πιάτου για 15min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό σκοτάδι, και μετράται η απορρόφηση στα 595 nm. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 και 10μg πρωτεΐνης από τα πρότυπα διαλύματα BSA. Η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης στα δείγματα υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

3.12.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Bradford

Υλικά: Εμπορικό χρωμογόνο αντιδραστήριο Bradford (Sigma-Aldrich): Χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε διάλυμα που περιέχει φωσφορικό οξύ και μεθανόλη. Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.12.3.

Η χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου Bradford για την ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος βασίζεται στο γεγονός ότι η μέγιστη απορρόφηση του όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 μεταβάλλεται από τα 465nm στα 595nm όταν η χρωστική προσδεθεί σε πρωτεΐνες. Ειδικότερα, η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 όταν είναι διαλυμένη σε ένα όξινο διάλυμα (αντιδραστήριο Bradford) απορροφά στα 465nm (καφεκόκκινο χρώμα). Στο όξινο περιβάλλον του αντιδραστηρίου η χρωστική είναι αρνητικά φορτισμένη και προσδένεται στα θετικά φορτισμένα μόρια της πρωτεΐνης. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής προκαλεί μετατόπιση στη μέγιστη απορρόφηση της χρωστικής από τα 465nm στα 595nm. Η χρωστική προσδένεται σε θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών, κυρίως στην αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη, σχηματίζοντας σύμπλοκο χρώματος μπλε. Δυνάμεις Van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν στην πρόσδεση της χρωστικής στα πρωτεϊνικά μόρια. Ο αριθμός των μορίων της χρωστικής που προσδένονται σε κάθε πρωτεϊνικό μόριο είναι περίπου ανάλογος των θετικών μορίων αμινοξέων που υπάρχουν στην πρωτεΐνη.

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται στη δοκιμασία Bradford είναι η εξής: Γίνεται ανάμιξη 5μL προτύπων διαλυμάτων BSA (0.125mg/mL, 0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL) ή 5μL πρωτεϊνικού δείγματος ή 5μL «τυφλού» με 250μL αντιδραστηρίου Bradford σε κάθε οπή του πιάτου 96 θέσεων. Σαν «τυφλό» χρησιμοποιείται ο διαλύτης των πρωτεϊνικών δειγμάτων που θα ποσοτικοποιηθούν. Ακολουθεί επώαση του πιάτου για

15min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό σκοτάδι, και μετράται η απορρόφηση στα 595 nm. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 και 10 µg πρωτεΐνης από τα πρότυπα διαλύματα BSA. Η περιεχόμενη στα δείγματα ποσότητα πρωτεΐνης υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

3.12.5. Προσδιορισμό φωσφολιπιδίων με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο

Υλικά: Kit μέτρησης φωσφολιπιδίων (Sentinel Diagnostics) που περιέχει: 1) αντιδραστήριο 1a: N-[Τρι(υδροξυμεθυλ)μεθυλ]-2 αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ (TES) 50mmol/L pH 7.6, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ 12mmol/L, EDTA 1.3mmol/L, νατραζίδιο < 0.1%, απορρυπαντικό. 2) αντιδραστήριο 1b (λυοφιλοποιημένο): TES 50mmol/L, φωσφολιπάση D > 1500 U/L, οξειδάση της χολίνης > 7.500 U/mL, υπεροξειδάση > 7000 U/mL, 4-αμινοαντιπυρίνη 1.2mmol/L, διάλυμα R1: 10ml αντιδραστηρίου 1a προστίθενται σε ένα φυαλίδιο αντιδραστηρίου 1b και ακολουθεί ήπια ανακίνηση (το διάλυμα R1 προθερμάνεται στους 37°C πριν τη χρήση), πρότυπο διάλυμα φωσφολιπιδίων 300mg/dL (Sentinel Diagnostics). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.12.3.

Τα φωσφολιπίδια προσδιορίζονται με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο. Η φωσφατιδυλοχολίνη, σφιγγομυελίνη και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη υδρολύονται παρουσία της φωσφολιπάσης D σε χολίνη και φωσφατιδικό οξύ ή N-ακυλο-σφιγγο-φωσφορικό ή λυσοφωσφατιδικό οξύ, αντίστοιχα. Η χολίνη οξειδώνεται από την οξειδάση της χολίνης σε βεταΐνη και H₂O₂ (υπεροξειδίου του υδρογόνου). Το H₂O₂ αντιδρά με 4-αμινοαντιπυρίνη και 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ σε μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση και σχηματίζει ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505nm. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τον προσδιορισμό των φωσφολιπιδίων είναι η εξής: Με τη χρήση του πρότυπου διαλύματος κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης (Πίνακας 3.1). Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης είναι 0, 3, 6, 12, 18 και 30µg φωσφολιπιδίων σε τελικό όγκο 10µL DPBS 1X ανά οπή του πιάτου 96 θέσεων. Το δείγμα rHDL-apoE3 προετοιμάζεται με την προσθήκη 5µL δείγματος σε 5µL DPBS 1X. Ως «τυφλό» δείγμα χρησιμοποιούνται 10µL DPBS 1X. Στη συνέχεια, προστίθενται 300µL διαλύματος R1 στα πρότυπα, στο rHDL-apoE3 δείγμα και στο «τυφλό» και αναμιγνύονται ήπια. Ακολουθεί επώαση του πιάτου των 96 θέσεων στους 37°C για 10min, υπό σκοτάδι, και μέτρηση της απορρόφησης στα 505nm. Η ποσότητα

φωσφολιπιδίων που περιέχονται στο δείγμα rHDL-apoE3 υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

Πίνακας 3.1. Όγκοι του προτύπου διαλύματος φωσφολιπιδίων και του DPBS 1X που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης φωσφολιπιδίων.

| Όγκος προτύπου διαλύματος φωσφολιπιδίων 300μg/dL (μL) | Όγκος DPBS 1X (μL) |
|---|--------------------|
| 0 | 10 |
| 1 | 9 |
| 2 | 8 |
| 4 | 6 |
| 6 | 4 |
| 10 | 0 |

3.13. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

3.13.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Υλικά: Trizma HCl (Sigma-Aldrich), Trizma Base (Sigma-Aldrich), γλυκίνη (Sigma-Aldrich), διάλυμα ακρυλαμιδίου/N-N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου 37,5:1, διάλυμα 30% (Bio-Rad), ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5M pH 8,8, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,0M pH 6,8, δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) (Sigma-Aldrich), διάλυμα SDS 10% (w/v): 1gr SDS και 10mL dH₂O, υπερθειϊκό αμμώνιο (Fluka/Applichem) διάλυμα APS 10% (w/v): 1gr APS και 10mL dH₂O, N,N-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED) (Sigma-Aldrich), β-μερκαπτοαιθανόλη (Applichem), DTT (Applichem), γλυκερόλη (Fluka), κυανούν της βρωμοφαινόλης (Applichem), διάλυμα φόρτωσης δείγματος 5X με β-μερκαπτοαιθανόλη (10mL): 0,3125M Tris-HCl, pH 6,8, 25% β-μερκαπτοαιθανόλη, 10% SDS, 50% (v/v) γλυκερόλη και 0.5% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης, διάλυμα φόρτωσης δείγματος 5X με DTT (5mL): 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,5M DTT, 10% SDS, 50% (v/v) γλυκερόλη και 0.5% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης (Fisher Bioreagents BP), διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X: 39 gr Tris, 144 gr γλυκίνη, 10 gr SDS. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στο 1L με dH₂O, διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X: 100mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10X και dH₂O σε συνολικό όγκο διαλύματος 1L, πρωτεϊνικοί δείκτες με γνωστά μοριακά βάρη: 1) PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder 7250-5kDa (ThermoFisher Scientific), 2) Novex Sharp Pre-stained Protein Standard 260-3.5 KDa (Invitrogen/ThermoFisher Scientific), 3) PageRuler

Prestained Protein Ladder 180-10 KDa (ThermoFisher Scientific), μεθανόλη (Applichem), οξικό οξύ (Fluka ή Sigma Aldrich), διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1%: 1gr Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fisher Bioreagents BP) στο 1L διαλύματος 50% (v/v) μεθανόλη, 7% (v/v) οξικό οξύ και 43% (v/v) dH₂O, διάλυμα αποχρωματισμού: 50% (v/v) μεθανόλη, 7% (v/v) οξικό οξύ και 43% (v/v) dH₂O, γυάλινες πλάκες διαστάσεων 10x8cm με ειδικές διαχωριστικές ταινιές για τη ρύθμιση του πάχους της πηκτής (0.75mm ή 1.5mm) (Bio-Rad), γυάλινες λεπτές πλάκες χωρίς ειδικές διαχωριστικές ταινιές (Bio-Rad), ειδική χτένα πάχους 0.75mm ή 1.5mm για το σχηματισμό φρεατίων στην πηκτή (Bio-Rad), συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-protean II (Bio-Rad), τροφοδοτικό Consort Bioblock E341, συσκευή θέρμανσης 24 θέσεων (VWR Scientific), αναδευτήρας (shaker machine, Labnet International), πιπέτες όγκου έως 10μL, 20μL, 200μL και 1000μL (Eppendorf), αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών (Sarstedt), ηλεκτρικός πιπεταδόρος αυτόματης αναρρόφησης και εκροής (Eppendorf), αποστειρωμένα σιφώνια όγκου 5mL, 10mL, 25mL (Sarstedt), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 15mL και 50mL (Greiner), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 0,5mL και 1,5mL (Kisker Biotech).

Με την ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με το μέγεθός τους κατά τη μετακίνησή τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης. Η πηκτή σχηματίζεται μετά από συμπολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου με το αντιδραστήριο διασταύρωσης N-N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο. Για να ξεκινήσει ο συμπολυμερισμός προστίθεται διάλυμα APS, ένας εκκινητής που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, καθώς και TEMED που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα συμπολυμερισμού. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε αποδιατακτικές συνθήκες, καθώς στην πηκτή περιέχεται SDS και στα δείγματα των πρωτεϊνών προς ηλεκτροφόρηση προστίθεται SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT. Η β-μερκαπτοαιθανόλη ή το DTT ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που υπάρχουν στις πρωτεΐνες. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που προσδένεται στα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης καταστρέφοντας σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών και σε συνδυασμό με το βρασμό επάγει την αποδιάταξή τους. Λόγω του αρνητικού φορτίου του SDS που είναι δεσμευμένο στη μετουσιωμένη πλέον πρωτεΐνη, το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο ώστε να μην επιδρά στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Το αρνητικό φορτίο του συμπλέγματος του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη είναι ανάλογο με τη μοριακή της μάζα. Οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες έχοντας διαφορετικό αρνητικό φορτίο ανάλογο της μοριακής τους μάζας

κινούνται μέσα στους πόρους της πηκτής από την άνοδο προς την κάθοδο με διαφορετική κινητικότητα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η διαφορετική κινητικότητα των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού οδηγεί στο διαχωρισμό τους. Το αποτελεσματικό εύρος διαχωρισμού των πρωτεϊνών στην πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων της και άρα από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου (όσο η περιεκτικότητα του ακρυλαμιδίου αυξάνει τόσο το μέγεθος των πόρων μειώνεται). Η περιεκτικότητα του πολυακρυλαμιδίου στην πηκτή επιλέγεται με βάση το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που αναλύονται με ηλεκτροφόρηση. Η ανάλυση των δειγμάτων που προκύπτουν από την έκφραση, την παραγωγή και τον καθαρισμό της αρoE3 γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 12% (v/v) (Πίνακας 3.2). Αντίστοιχα, τα δείγματα έκφρασης, παραγωγής και καθαρισμού της His-3C πρωτεΐσης αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% (v/v) (Πίνακας 3.2).

Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες ακολουθείται η εξής πειραματική πορεία: Αρχικά παρασκευάζονται δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου, η πηκτή επιστοίβασης και η πηκτή διαχωρισμού. Οι δύο πηκτές διαφέρουν στο pH, στη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και άρα στο μέγεθος των πόρων, και στην ιοντική ισχύ (Πίνακας 3.2). Η πηκτή επιστοίβασης χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο pH και μικρότερη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο, διαθέτοντας έτσι μεγαλύτερους πόρους. Τα χαρακτηριστικά αυτά σε συνδυασμό με την περιεκτικότητα της πηκτής επιστοίβασης σε ιόντα επιτρέπουν την επιστοίβαση των πρωτεϊνών σε μια στενή ζώνη, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη είσοδό τους στην πηκτή διαχωρισμού. Η πηκτή διαχωρισμού χαρακτηρίζεται από υψηλότερο pH και μεγαλύτερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, άρα διαθέτει στενότερους πόρους. Το πυκνότερο πλέγμα μέσω του οποίου διέρχονται τα μόρια των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Κατόπιν ετοιμάζεται το sandwich της ηλεκτροφόρησης με την κατάλληλη τοποθέτηση των δύο γυάλινων πλακών. Μετά την παρασκευή του μίγματος της πηκτής διαχωρισμού, αυτό τοποθετείται στον ενδιάμεσο χώρο των δύο πλακών του sandwich ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πολυμεριστεί για ~35min. Στη συνέχεια, τοποθετείται η χτένα και προστίθεται το μίγμα της πηκτής επιστοίβασης. Μετά από ~30min πολυμερισμού, απομακρύνεται η χτένα και ξεπλένονται με H₂O τα φρεάτια που έχουν σχηματιστεί. Τα δείγματα πριν τοποθετηθούν στα φρεάτια της πηκτής επιστοίβασης προετοιμάζονται ως εξής: Ίση ποσότητα πρωτεΐνης ανά δείγμα αναμειγνύεται με διάλυμα φόρτωσης δείγματος 5X σε

όγκο που αντιστοιχεί στο 1/4 του όγκου του πρωτεϊνικού δείγματος, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος φόρτωσης στο δείγμα ηλεκτροφόρησης να είναι 1X. Το διάλυμα φόρτωσης περιλαμβάνει β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT και SDS για να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος στους 95 °C για 5min. Κατόπιν, προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X στην άνω και στην κάτω μονάδα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή. Στο διάλυμα φόρτωσης περιέχεται, επίσης, γλυκερόλη, η οποία αυξάνει το ειδικό βάρος του μίγματος και επιτρέπει την καλύτερη είσοδο και τοποθέτηση των δειγμάτων στα φρεάτια. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται πρωτεϊνικοί δείκτες με γνωστά μοριακά βάρη που αναλύονται παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα στην ίδια πηκτή για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους που αντιστοιχεί στην κάθε περιοχή του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε σταθερή τάση 120V και διαρκεί ~1,5h.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών στην αντίστοιχη περιοχή του μοριακού βάρους γίνεται με την εμβάπτιση της πηκτής μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 για ~1h, υπό ήπια ανακίνηση, το οποίο αλληλεπιδρά κυρίως με τα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (αργινίνη, ιστιδίνη). Ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής σε διάλυμα αποχρωματισμού για ~30-45min, υπό ήπια ανακίνηση, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών.

Πίνακας 3.2: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 12% (v/v) ή 15% (v/v) και επιστοίβασης για ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες.

| Πηκτή διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο (v/v) | Πηκτή επιστοίβασης περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 5% (v/v) (4 mL) | | | |
|--|---|------------|------------------------------|-------|
| | 12% (10mL) | 15% (10mL) | | |
| ddH ₂ O | 3,3mL | 2,3mL | ddH ₂ O | 2,7mL |
| Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% | 4,0mL | 5,0mL | Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% | 670μL |
| Διάλυμα Tris-HCl 1,5M pH 8,8 | 2,5mL | 2,5mL | Διάλυμα Tris-HCl 1,0M pH 6,8 | 500μL |
| Διαλύμα SDS 10% | 100μL | 100μL | Διαλύμα SDS 10% | 40μL |
| Διάλυμα APS 10% | 100μL | 100μL | Διάλυμα APS 10% | 40μL |
| TEMED | 4μL | 4μL | TEMED | 4μL |

3.13.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native PAGE)

Υλικά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v) χωρίς SDS (4-20% Mini-Protean TGX Precast Protein gel, Bio-Rad), διάλυμα φόρτωσης δείγματος 2X για ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, 30mL: 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% γλυκερόλη (Fluka), 0,01% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης (Fisher Bioreagents BP), διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X για ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (αποθηκεύεται στους 4°C): 3.9 gr Tris και 14.41gr γλυκίνη (Sigma-Aldrich) διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο 1L, πρωτεϊνικοί δείκτες με γνωστά μοριακά βάρη (669, 440, 232, 140 και 66kDa) ειδικό για ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis, 17-0445-01). Τα επιπλέον υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που περιγράφονται στην Ενότητα 3.13.1.

Ο επιτυχής σχηματισμός σωματιδίων rHDL-apoE3 διαπιστώνεται με την ηλεκτροφόρηση δείγματος rHDL-apoE3 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% (v/v) ή διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες στους 4°C (βλ. Ενότητα 3.11). Η ηλεκτροφόρηση δείγματος rHDL-apoE3 σε πηκτή διαβαθμισμένης πυκνότητας 4-20% (v/v) (εμπορικά διαθέσιμη, χωρίς SDS, βλ. Υλικά Ενότητας 3.13.2) σε μη αποδιατακτικές συνθήκες παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης των υποπληθυσμών των σωματιδίων rHDL-apoE3 με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο. Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού 8% (v/v) και πηκτής επιστοιβασής (Πίνακας 3.3) δεν προστίθεται SDS προκειμένου να μην καταστραφούν οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις της apoE3 με τα λιπώματα στα σωματίδια rHDL-apoE3. Για τον ίδιο λόγο, το ειδικό διάλυμα φόρτωσης δείγματος 2X που χρησιμοποιείται δεν περιέχει SDS και 2-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT και δεν προηγείται θέρμανση των δειγμάτων πριν την ηλεκτροφόρηση. Επιπροσθέτως, το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X που χρησιμοποιείται (διατηρείται στους 4°C) δεν περιέχει SDS και η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται στους 4°C. Τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες προετοιμάζονται ως εξής: τα μL των rHDL-apoE3 σωματιδίων που αντιστοιχούν σε 5μg, 7,5μg ή 10μg αναμειγνύονται με το διάλυμα φόρτωσης δείγματος 2X σε αναλογία 1:1 στους 4°C, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος φόρτωσης στο μίγμα ηλεκτροφόρησης να είναι 1X. Με τον ίδιο τρόπο προετοιμάζεται και το δείγμα της αναδιπλωμένης ελεύθερης λιπιδίων apoE3 (5μg, 7,5μg ή 10μg). Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή στους 4°C. Παράλληλα φορτώνονται πρωτεϊνικοί δείκτες υψηλής μοριακής μάζας με γνωστά μοριακά βάρη και γνωστές υδροδυναμικές διαμέτρους ειδικό

για ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες για τον υπολογισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων rHDL-apoE3. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται υπό σταθερή τάση 50V για 1h και ακολουθως 90V για 3-4h στους 4°C.

Η οπτικοποίηση των ζωνών που αντιστοιχούν στα σωματίδια rHDL-apoE3 και στην τυχόν υπάρχουσα ελεύθερη λιπιδίων apoE3 στην αντίστοιχη περιοχή του μοριακού βάρους με γίνεται με την εμβάπτιση της πηκτής μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Blue R-250 για ~1h και επακόλουθο αποχρωματισμό της σε διάλυμα αποχρωματισμού για ~30-45min, υπό ήπια ανακίνηση.

Πίνακας 3.3: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 8% (v/v) και επιστοίβασης για ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.

| | Πηκτή διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 8% (v/v) (10 mL) | Πηκτή επιστοίβασης περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 5% (v/v) (4 mL) | |
|------------------------------|---|---|---------|
| ddH2O | 4,7mL | ddH2O | 2,788mL |
| Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% | 2,7mL | Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% | 664μL |
| Διάλυμα Tris-HCl 1,5M pH 8,8 | 2,5mL | Διάλυμα Tris-HCl 1,0M pH 6,8 | 504μL |
| Διάλυμα APS 10% | 100μL | Διάλυμα APS 10% | 40μL |
| TEMED | 6μL | TEMED | 4μL |

3.14. Απομόνωση HDL από ορό αίματος με το αντιδραστήριο θειϊκής δεξτράνης-χλωριούχου μαγνησίου

Υλικά: Ορός αίματος ανθρώπου, θειϊκή δεξτράνη (Dextran-Sulfate, Dextralip, Sigma-Aldrich) διάλυμα θειϊκής δεξτράνης συγκέντρωσης 20gr/L σε dH2O (pH = 7), ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂•6H₂O, Sigma-Aldrich), διάλυμα MgCl₂•6H₂O συγκέντρωσης 1mol/L σε dH2O (pH = 7), NaCl (Merk), διάλυμα NaCl 0.15M σε dH2O. Όλα τα διαλύματα αποθηκεύονται στους 4°C. Κυκλοαναδευτήρας (Vortex-2 Genie, Scientific Industries), ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος Heraecus Biofuge Pico, αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erppendorf όγκου 1,5 mL (Kisker Biotech), πιπέτες όγκου έως 10μL, 20μL, 200μL και 1000μL (Erppendorf), αποστειρωμένα ρύγγη πιπετών (Sarstedt), ηλεκτρικός πιπεταδόρος αυτόματης

αναρρόφησης και εκροής (Eppendorf), αποστειρωμένα σιφώνια όγκου 5mL, 10mL, 25mL (Sarstedt), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 15mL και 50mL (Greiner), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου eppendorf όγκου 1,5mL (Kisker Biotech).

Παρουσία ιόντων χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$), η θεϊκή δεξτράνη σχηματίζει επιλεκτικά υδατοδιαλυτά σύμπλοκα με την HDL του ορού, ενώ οι μεγαλύτερες και πλούσιες σε λιπίδια λιποπρωτεΐνες VLDL, IDL και LDL σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα τα οποία καταβυθίζονται με φυγοκέντρηση. Ο διαχωρισμός των HDL από τις non-HDL λιποπρωτεΐνες του ορού με το αντιδραστήριο θεϊκής δεξτράνης-χλωριούχου μαγνησίου στηρίζεται κατά κύριο λόγο στο ότι τα HDL σωματίδια δεν περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β (αποΒ), η οποία είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα αργινίνης και αποτελεί το κυρίο πρωτεϊνικό συστατικό των πλούσιων σε λιπίδια VLDL, IDL και LDL. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων των πολυανιόντων και των θετικά φορτισμένων ομάδων των πρωτεϊνών στις λιποπρωτεΐνες ευνοεί την καθίζηση των λιποπρωτεϊνών. Επίσης, τα δισθενή ιόντα μετάλλων αλληλεπιδρούν με αρνητικά φορτισμένες ομάδες (πχ. των φωσφολιπιδίων) των λιποπρωτεϊνών ευνοώντας το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων. Επομένως, η αλληλεπίδραση των λιποπρωτεϊνών με τα πολυανιόντα σε συνδυασμό με τα δισθενή κατιόντα οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων των VLDL, IDL και LDL, ενώ οι HDL παραμένουν διαλυτές στο υπερκείμενο.

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται στην απομόνωση HDL από ορό με το αντιδραστήριο θεϊκής δεξτράνης-χλωριούχου μαγνησίου είναι η εξής: Πριν την έναρξη του πειράματος τα δείγματα ορού αίματος του ανθρώπου και τα διαλύματα θεϊκής δεξτράνης 20gr/L και $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1mol/L παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Παρασκευάζεται το ενεργό αντιδραστήριο καταβύθισης το οποίο είναι ένα διάλυμα θεϊκής δεξτράνης-χλωριούχου μαγνησίου με συγκέντρωση θεϊκής δεξτράνης 10gr/L και $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 500mmol/L. Για την παρασκευή του αναμιγνύονται ίσοι όγκοι διαλυμάτων θεϊκής δεξτράνης 20gr/L και $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1mol/L. Σε κάθε δείγμα ορού προστίθεται ενεργό αντιδραστήριο καταβύθισης σε αναλογία όγκου 10:1 (δείγμα ορού:αντιδραστήριο καταβύθισης) και το μίγμα αναμιγνύεται σε κυκλοαναδευτήρα. Όταν το ενεργό αντιδραστήριο καταβύθισης προστεθεί στο δείγμα προκύπτει ένα μίγμα με τελική συγκέντρωση θεϊκής δεξτράνης 0,9gr/L και $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 45mmol/L. Ακολουθεί επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στα 12.500rpm στους 4°C για 40min. Οι VLDL, IDL και LDL λιποπρωτεΐνες του ορού καταβυθίζονται με μορφή ιζήματος. Το διαυγές υπερκείμενο που περιέχει τις HDL

λιποπρωτεΐνες του ορού συλλέγεται σε σωληνάριο τύπου erpedorf και αποθηκεύεται στους -20°C.

Στην περίπτωση που το υπερκείμενο παρουσιάζει θολερότητα, ένδειξη ατελούς καταβύθισης των non-HDL λιποπρωτεϊνών λόγω υψηλής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων στον ορό, προστίθεται καθορισμένος όγκος διαλύματος NaCl 0.15M, επιπλέον αντιδραστήριο καταβύθισης (στην ίδια αναλογία όγκου που χρησιμοποιείται παραπάνω) και επαναλαμβάνεται η παραπάνω πειραματική διαδικασία.

3.15. Κυτταροκαλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τρεις τύποι ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου: 1) πρωτογενή ενδοθηλιακά κύτταρα από αορτή υγιούς ενήλικου ανθρώπου (HAEC – Human Aortic Endothelial Cells, CC-2535, Lonza Walkersville Inc.), 2) τα πρωτογενή ενδοθηλιακά κύτταρα από στεφανιαία αρτηρία υγιούς ενήλικου ανθρώπου (HCAEC - Human Coronary Artery Endothelial Cells, 300-05a, Cell Applications, Inc.) και 3) η ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926 που προήλθε από πρωτογενή ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από φλέβα ομφάλιου λώρου υγιούς ενήλικου ανθρώπου (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Όλες οι πειραματικές διεργασίες που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιούνται κάτω από αυστηρά ασηπτικές συνθήκες σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής.

3.15.1.Κυτταροκαλλιέργεια των HAEC κυττάρων

Υλικά: Κρυοσυντηρούμενο φυαλίδιο HAEC κυττάρων (γενιάς 3) (CC-2535, Lonza Walkersville Inc.) κατεψυγμένα σε 1mL διαλύματος κατάψυξης που περιέχει: 1) 90% (v/v) EGM-2 θρεπτικό υλικό σύστασης 10% (v/v) βόειο εμβρυακό ορό (FBS) και 1% (v/v) μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης και 2) 10% (v/v) διμεθυλοσουλφοξίδιο (DMSO), καλλιέργεια HCAEC κυττάρων, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων DPBS 1X χωρίς CaCl₂ και MgCl₂ (Gibco/Thermo Fisher Scientific), πλήρες θρεπτικό υλικό σύστασης 2% (v/v) FBS που αποτελείται από: 1) 97% (v/v) βασικό θρεπτικό υλικό (endothelial basal medium-2 (EBM-2), Lonza) και 2) 3% (v/v) συμπληρωματικοί παράγοντες ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων (FBS, αυξητικοί παράγοντες, όπως VEGF, hEGF, hFGF-β και IGF, ορμόνες, κυτταροκίνες, 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη) (EGM-2 Bulletkit και EGM-2 SingleQuots Kit Suppl. & Growth Factors, Lonza), διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Lonza), αποστειρωμένα τρυβλία (p100) κυτταροκαλλιέργειας με διάμετρο 60mm (Nunc/Thermo Fischer Scientific), αποστειρωμένα σιφώνια όγκου 5, 10 και 25mL

(Sarstedt), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 15 και 50mL (Greiner Bio-One), κρουοσυντηρούμενα φυαλίδια κατάψυξης κυττάρων (Corning), φυγόκεντρος Eppendorf 5804, απαγωγός κάθετης νηματικής ροής, κλίβανος επώασης κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific), οπτικό μικροσκόπιο, υδατόλουτρο στους 37°C.

3.15.1.1. Ανακαλλιέργεια των HAEC κυττάρων

Για την ανακαλλιέργεια των HAEC κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 60mm (p100) και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων (δύο φορές) με ρυθμιστικό διάλυμα DPBS 1X 1mL. Τα κύτταρα επάζονται σε διάλυμα θρυψίνης/EDTA 2mL για 3 min στους 37°C, ώστε να αποκολληθούν πλήρως από τον πυθμένα του τρυβλίου. Για την απενεργοποίηση της θρυψίνης προστίθεται τριπλάσιος όγκος πλήρους θρεπτικού υλικού που περιέχει 2% (v/v) FBS στα θρυψινοποιημένα κύτταρα (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.15.1). Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε σωληνάρια τύπου falcon 15mL και φυγοκεντρείται στα 220 x g για 5min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκευμένου, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε καθορισμένο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού. Το κυτταρικό εναιώρημα ισομοιράζεται σε τρία νέα p100 τρυβλία με 6 ml πλήρους θρεπτικού υλικού στο κάθε ένα, ώστε το κάθε τρυβλίο να περιέχει το 1/3 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο 5% CO₂ στους 37°C. Το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό κάθε δύο μέρες μέχρι τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν στο 80-85% της κατάστασης συμβολής και τότε υφίστανται θρυψινοποίηση. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται μέχρι 15 μέρες.

Τα HAEC κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των μικροσυστοιχιών και της qRT-PCR για τη μελέτη της επίδρασης της rHDL-apoE3 στη γονιδιακή έκφραση (Ενότητες 3.18 και 3.20). Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν HAEC κύτταρα σε γενιά 5-7. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του Εργαστηρίου του Καθηγητή κ. Β. Ζαννή στον Τομέα Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Βοστώνης.

3.15.1.2. Κατάψυξη και απόψυξη των HAEC κυττάρων

Για τη δημιουργία αποθέματος κατεψυγμένων κυττάρων, HAEC κύτταρα που έχουν πολλαπλασιαστεί στο 80-85% της κατάστασης συμβολής σε p100 τρυβλίο θρυψινοποιούνται και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται (Ενότητα 3.15.1.1). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 2mL διαλύματος κατάψυξης που περιέχει 90% (v/v) πλήρες θρεπτικό υλικό (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.15.1) και 10% (v/v) DMSO. Το κυτταρικό

εναιώρημα μοιράζεται ισόποσα σε δύο αποστειρωμένα φυαλίδια κατάψυξης κυττάρων, ώστε κάθε φυαλίδιο να περιέχει το 1/2 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού (1 mL κυττάρων ανά φυαλίδιο). Τα φυαλίδια αποθηκεύονται στους -80°C για 24h, ώστε να επιτευχθεί ένας αργός ρυθμός κατάψυξης των κυττάρων (ιδανικά μείωση θερμοκρασίας 1°C/min). Κατόπιν, τα φυαλίδια αποθηκεύονται σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196°C).

Κατά την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται γρήγορο ξεπάγωμα. Το φυαλίδιο με τα κατεψυγμένα κύτταρα ανασύρεται από το υγρό άζωτο και τα κύτταρα αποψύχονται αμέσως σε υδατόλουτρο στους 37°C. Στα κύτταρα του φυαλιδίου προστίθεται ήπια 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε p100 τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό (5mL). Μετά από 18-24h καλλιέργειας, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο, ώστε να απομακρυνθεί το DMSO και τα νεκρά κύτταρα, και προστίθενται 6mL φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται 1-2 φορές μετά από την έναρξη της καλλιέργειάς τους, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε πειραματικές δοκιμασίες.

3.15.2. Κυτταροκαλλιέργεια των HCAEC κυττάρων

Υλικά: Κρυσταλλοποιημένο φυαλίδιο HCAEC κυττάρων (γενιάς 2) (300-05a, Cell Applications, Inc) κατεψυγμένα σε 1mL διαλύματος κατάψυξης που περιέχει: 1) 90% (v/v) θρεπτικό υλικό σύστασης 10% (v/v) βόειο εμβρυακό ορό (FBS) και 1% (v/v) μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης και 2) 10% (v/v) διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), καλλιέργεια HCAEC κυττάρων, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων HBSS (Cell Applications, Inc), πλήρες θρεπτικό υλικό σύστασης 5% (v/v) FBS (Cell Applications, Inc) που αποτελείται από: 1) 94% (v/v) βασικό θρεπτικό υλικό (Cell Applications, Inc) και 2) 6% (v/v) συμπληρωματικοί παράγοντες ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων (FBS, αυξητικοί παράγοντες, όπως VEGF και PDGF, 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη) (Cell Applications, Inc), διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Cell Applications, Inc), διάλυμα απενεργοποίησης της θρυψίνης (Cell Applications, Inc), κρυσταλλοποιημένο βασικό θρεπτικό υλικό κατάψυξης που περιέχει 15% (v/v) DMSO χωρίς L-γλουταμίνη (Lonza), αποστειρωμένες φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με διαστάσεις επιφάνειας 75cm² ή 25cm² (Greiner Bio-One), αποστειρωμένα σιφώνια όγκου 5, 10 και 25mL (Sarstedt), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 15 και 50mL (Greiner Bio-One), κρυσταλλοποιημένα φυαλίδια κατάψυξης κυττάρων (Corning), φυγόκεντρος Eppendorf 5804, απαγωγός κάθετης νηματικής ροής, κλίβανος επώασης κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37 °C (Thermo Scientific), οπτικό μικροσκόπιο, υδατόλουτρο στους 37°C.

3.15.2.1. Ανακαλλιέργεια των HCAEC κυττάρων

Για την ανακαλλιέργεια των HCAEC κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας επιφάνειας 75cm² ή 25cm² και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων (δύο φορές) με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (1mL ανά 75cm² φλάσκα και 0,5mL ανά 25cm² φλάσκα). Τα κύτταρα επώάζονται σε διάλυμα θρυψίνης/EDTA (2mL ανά 75cm² φλάσκα και 1mL ανά 25cm² φλάσκα) για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το 90% του διαλύματος θρυψίνης/EDTA από τα κύτταρα, προστίθεται διάλυμα απενεργοποίησης της θρυψίνης που περιέχει 2% (v/v) FBS (3mL ανά 75cm² φλάσκα και 1,5mL ανά 25cm² φλάσκα) και ακολουθεί ήπιο πιπετάρισμα, ώστε να αποκόλληθούν πλήρως τα θρυψινοποιημένα κύτταρα από τον πυθμένα της φλάσκας. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε σωληνάρια τύπου falcon 15mL και φυγοκεντρείται στα 220 x g για 5min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε καθορισμένο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού (βλ. Υλικά Ενότητας 3.15.1) και ακολουθεί μοίρασμα του κυτταρικού εναιωρήματος σε νέες 75cm² φλάσκες που περιέχουν 10mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Συνήθως, το 1/4 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού της 75cm² φλάσκας ή ο συνολικός κυτταρικός πληθυσμός της 25cm² φλάσκας μεταφέρεται στις νέες φλάσκες. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο 5% CO₂ στους 37°C. Το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό κάθε δύο μέρες μέχρι τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν στο 80% της κατάστασης συμβολής και τότε υφίστανται θρυψινοποίηση. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται μέχρι 15 μέρες.

Τα HCAEC κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν: 1) στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης western για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης μετά από έκθεση στην rHDL-αροE3 (Ενότητα 3.21.1), 2) στις δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» για τη μελέτη της επίδρασης της rHDL-αροE3 στην κυτταρική μετανάστευση (Ενότητα 3.25.1.2) και 3) στα πειράματα χημικής αναστολής των MEK1/2 και PI3K κινασών για τη μελέτη της επίδρασης της rHDL-αροE3 στην πρωτεϊνική έκφραση/φωσφορυλίωση και στην κυτταρική μετανάστευση παρουσία και απουσία του εκάστοτε αναστολέα (Ενότητες 3.28.2-3.28.3). Για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν HCAEC κύτταρα σε γενιά 5-10. Όλα τα προαναφερόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κα Δ. Σανούδου στον Τομέα Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3.15.2.2. Κατάψυξη και απόψυξη των HCAEC κυττάρων

Για τη δημιουργία αποθέματος κατεψυγμένων κυττάρων, HCAEC κύτταρα που έχουν πολλαπλασιαστεί στο 80% της κατάστασης συμβολής σε 75cm² φλάσκα θρυψινοποιούνται

και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται (Ενότητα 3.14.1.1). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 3mL διαλύματος κατάψυξης που περιέχει 1mL (33,33% v/v) πλήρους θρεπτικού υλικού (βλ. Υλικά Ενότητας 3.14.1) και 2mL (66,67% v/v) κρυσπροστατευτικού θρεπτικού υλικού κατάψυξης σύστασης 15% (v/v) DMSO. Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται ισόποσα σε τρία αποστειρωμένα φιαλίδια κατάψυξης κυττάρων (1 mL κυττάρων ανά φιαλίδιο), ώστε κάθε φιαλίδιο να περιέχει το 1/3 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού σε συγκέντρωση DMSO 10% (v/v). Τα φιαλίδια αποθηκεύονται σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196°C).

Κατά την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται γρήγορο ξεπάγωμα. Το φιαλίδιο με τα κατεψυγμένα κύτταρα ανασύρεται από το υγρό άζωτο και τα κύτταρα αποψύχονται αμέσως σε υδατόλουτρο στους 37°C. Στα κύτταρα του φιαλιδίου προστίθεται ήπια 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε 25cm² φλάσκα που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό (3mL). Μετά από 18-24h καλλιέργειας, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα, ώστε να απομακρυνθεί το DMSO και τα νεκρά κύτταρα, και προστίθενται 4mL φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται 1-2 φορές μετά από την έναρξη της καλλιέργειάς τους, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε πειραματικές δοκιμασίες.

3.15.3. Κυτταροκαλλιέργεια των EA.hy926 κυττάρων

Υλικά: Καλλιέργεια EA.hy926 κυττάρων, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων DPBS 1X χωρίς CaCl₂ και MgCl₂ (Gibco/Thermo Fisher Scientific), πλήρες θρεπτικό υλικό που αποτελείται από: 1) 88% (v/v) βασικό θρεπτικό υλικό με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης 1g/L (DMEM, Gibco/ThermoFisher Scientific), 2) 10% (v/v) FBS (Gibco/ThermoFisher Scientific) και 3) 2% (v/v) μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομικίνης, διάλυμα 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομικίνης (Gibco/Thermo Fisher Scientific), διάλυμα θρυψίνης 0,25% (w/v)/EDTA (Gibco/Thermo Fisher Scientific), DMSO (Sigma-Aldrich). Τα επιπλέον υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με τα αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.14.1.

3.15.3.1. Ανακαλλιέργεια των EA.hy926 κυττάρων

Για την ανακαλλιέργεια των EA.hy926 κυττάρων, όταν πολλαπλασιαστούν στο 80% της κατάστασης συμβολής, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αυτήν που περιγράφεται στην Ενότητα 3.14.1.1 με τις εξής διαφορές: 1) Για την έκπλυση των κυττάρων χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα DPBS 1X. 2) Τα κύτταρα επιάζονται σε διάλυμα θρυψίνης 0,25% (w/v)/EDTA για 3 min στους 37°C, ώστε να αποκολληθούν πλήρως από την επιφάνεια της

φλάσκας. 3) Για την απενεργοποίηση της θρυψίνης προστίθεται τριπλάσιος όγκος πλήρους θρεπτικού υλικού που περιέχει 10% (v/v) FBS στα θρυψινοποιημένα κύτταρα (βλ. Υλικά Ενότητας 3.14.2). 4) Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 1.250rpm για 5min. 5) Συνήθως, το 1/6 ή 1/8 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού της 75cm² φλάσκας και το 1/2 του κυτταρικού πληθυσμού της 25cm² φλάσκας μεταφέρεται στις νέες 75cm² φλάσκες. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται μέχρι 1 μήνα.

Τα EA.hy926 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν: 1) στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης western για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης μετά από έκθεση στην rHDL-aroE3 (Ενότητα 3.21.2), 2) στις δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» και τύπου «Transwell» για τη μελέτη της επίδρασης της rHDL-aroE3 στην κυτταρική μετανάστευση (Ενότητες 3.25.2.2 και 3.27) και 3) στα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 για τη μελέτη του ρόλου του ID1 στην επαγόμενη από την rHDL-aroE3 ενεργοποίηση των κινασών MEK1/2 και PI3K και κυτταρική μετανάστευση (Ενότητες 3.29.2-3.29.5). Για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν EA.hy926 κύτταρα σε γενιά 5-14. Όλα τα προαναφερόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κα Δ. Σανούδου στον Τομέα Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3.15.3.2. Κατάψυξη και απόψυξη των EA.hy926 κυττάρων

Για τη δημιουργία αποθέματος κατεψυγμένων κυττάρων, EA.hy926 κύτταρα που έχουν πολλαπλασιαστεί στο 80% της κατάστασης συμβολής σε 75cm² φλάσκα θρυψινοποιούνται και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται (Ενότητα 3.14.2.1). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 3mL διαλύματος κατάψυξης που περιέχει 90% (v/v) πλήρες θρεπτικό υλικό (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.15.2) και 10% (v/v) DMSO. Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται ισόποσα σε τρία αποστειρωμένα φυαλίδια κατάψυξης κυττάρων, ώστε κάθε φυαλίδιο να περιέχει το 1/3 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού (1 mL κυττάρων ανά φυαλίδιο). Τα φυαλίδια αποθηκεύονται στους -80°C για 24h, ώστε να επιτευχθεί ένας αργός ρυθμός κατάψυξης των κυττάρων (ιδανικά μείωση θερμοκρασίας 1°C/min). Κατόπιν, τα φυαλίδια αποθηκεύονται σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196°C).

Για την απόψυξη των EA.hy926 κυττάρων ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφεται στην Ενότητα 3.15.1.2 με τις εξής διαφορές: Μετά την προσθήκη 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού στα κύτταρα του φυαλιδίου, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου falcon 15mL που περιέχει 2mL πλήρους θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρείται στα 1.250rpm για 5min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το

ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 0,5mL πλήρους θρεπτικού υλικού και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε 25cm² φλάσκα που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό (3,5mL).

3.16. Απομόνωση ολικού RNA, ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA

3.16.1. Απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο Trizol

Υλικά: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων DPBS 1X χωρίς Ca²⁺ και Mg²⁺ (Gibco/Thermo Fisher Scientific), αντιδραστήριο απομόνωσης ολικού RNA Trizol (Ambion/Thermo Fisher Scientific), διαλύμα απολύμανσης επιφανειών που καταστρέφει τις RNAάσες δι'επαφής (Ambion/Thermo Fisher Scientific), χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκόολη μείγμα 49:1 (Fluka-Sigma Aldrich), ισοπροπυλική αλκόολη ή ισοπροπανόλη απαλλαγμένη από DNAάσες/RNAάσες/πρωτεάσες (Applichem), ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (high salt solution buffer) με σύσταση: 1,2M NaCl και 0,8M Sodium Chloride, αιθανόλη 75% (v/v) (stock 99% (v/v), Applichem), υπερκάθαρο νερό (γH₂O) απαλλαγμένο από DNAάσες και RNAάσες (nuclease-free water, Ambion/Thermo Fisher Scientific), πιπέτες όγκου έως 2μL, 10μL, 20μL, 200μL και 1000μL (Eppendorf), ρύγχη πιπετών με φίλτρο όγκου 100-1000 μL ή 200 μL ή 20 μL ή 0,5-10 μL ή 0,1-10 μL (Greiner Bio-One), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon όγκου 15mL και 50mL (Greiner Bio-One), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 1,5mL απαλλαγμένα από RNAάσες και DNAάσες (Kisker Biotech), ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος Heraecus Biofuge Pico

Η απομόνωση ολικού RNA από τα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-αροE3 ή PBS που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα των μικροσυστοιχιών και της qRT-PCR (Ενότητες 3.18 και 3.20) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol. Η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης ολικού RNA πραγματοποιείται σε αποστειρωμένο θάλαμο και πριν την έναρξή της, η επιφάνεια εργασίας του θαλάμου, οι πιπέτες και ο υπόλοιπος εξοπλισμός που χρησιμοποιείται αποστειρώνονται με UV για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων με ξένο DNA. Στη συνέχεια, η επιφάνεια εργασίας και ο απαραίτητος εξοπλισμός καθαρίζονται με διάλυμα απολύμανσης επιφανειών που καταστρέφει της RNAάσες δι'επαφής, ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του απομονωμένου RNA.

Το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA περιγράφεται ως εξής: Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα, γίνεται έκπλυση (2 φορές) των κυτάρων με 1ml παγωμένου (4°C) DPBS 1X και προστίθεται 1ml παγωμένου Trizol στα κύτταρα. Τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα του τρυβλίου με ήπιες αναρροφήσεις και εκροφήσεις με τη χρήση πιπέτας, και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε αποστειρωμένο

σωληνάριο τύπου errendorf. Το εναιώρημα των κυττάρων επώαζεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (RT), ώστε να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων. Στο λύμα των κυττάρων προστίθενται 200μl παγωμένου μίγματος χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκόολη (49:1), το οποίο προκαλεί διάσπαση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, το μίγμα αναδεύεται ήπια και επώαζεται για 3min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Η φυγοκέντρηση οδηγεί στο σχηματισμό τριών φάσεων: η ανώτερη διαυγής φάση περιέχει διαλυμένο το ολικό κυτταρικό RNA, η μεσαία φάση περιέχει το ολικό DNA και η κατώτερη ερυθρή φάση περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών. Η ανώτερη υδατική φάση μεταφέρεται προσεχτικά σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου errendorf, και προστίθενται 250μl ισοπροπανόλης και 250μl ρυθμιστικού διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.16.1). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 30min στους 4°C. Το μίγμα φυγοκεντρείται σε 12.000 g για 10 λεπτά στους 4 °C, ώστε να επιτευχθεί η κατακρήμνιση του RNA. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά, και πραγματοποιείται πλύσιμο του ιζήματος RNA με 75% (v/v) αιθανόλη ως εξής: Στο ίζημα RNA προστίθεται 75% (v/v) αιθανόλη 1 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί καλό στέγνωμα του ιζήματος RNA σε θερμοκρασία δωματίου (ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη). Τέλος, το ίζημα RNA διαλυτοποιείται σε 20-30 μl υπερκάθαρο H₂O απαλλαγμένο από DNAάσες και RNAάσες και αποθηκεύεται στους -80 °C. Δείγμα από το απομονωμένο RNA δεν αποθηκεύεται στους -80 °C και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητάς του (καθαρότητα και δομική ακεραιότητα) και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής του (Ενότητα 3.16.2).

3.16.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού RNA και έλεγχος της καθαρότητάς και ποιότητάς του

Υλικά: Φασματοφωτόμετρο “Nanodrop ND-1000” (Thermo Fisher Scientific Inc), υπερκάθαρο νερό (γH₂O) απαλλαγμένο από DNAάσες και RNAάσες (nuclease-free water, Ambion/Thermo Fisher Scientific), αγαρόζη molecular biology grade (Thermo Fisher Scientific), διαλύμα φόρτωσης δείγματος 10X (Thermo Fisher Scientific), 100bp DNA ladder (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0,5X TBE από stock 10X TBE, χρωστική νουκλεϊκών οξέων Gel Red Nucleic Acid Gel Stain 10,000 σε H₂O (Biotium) που παρεμβάλλεται μεταξύ των μορίων RNA και επιτρέπει την άμεση οπτικοποίηση των ζωνών RNA, καθώς φθορίζει ύστερα από διέγερση του δείγματος με υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Πηκτή αγαρόζης 1% που παρασκευάζεται ως εξής: 0,5g αγαρόζης

διαλύονται με θέρμανση στους 100°C σε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X. Ακολουθεί προσθήκη 2μl χρωστικής Gel Red (όταν η θερμοκρασία του διαλύματος υποχωρήσει περίπου στους 50°C) και το διάλυμα αποχύνεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει προηγουμένως τοποθετηθεί ειδικό κτενάκι. Η πηκτή σταθεροποιείται μετά από περίπου 40min. Διαλύμα απολύμανσης επιφανειών που καταστρέφει τις RNAάσες δι'επαφής (Ambion/Thermo Fisher Scientific), συσκευή ηλεκτροφόρησης Wide Mini-sub cell (Bio-Rad), η οποία εκπλένεται πριν τη χρήση της με διάλυμα απολύμανσης επιφανειών που καταστρέφει τις RNAάσες δι'επαφής για την αναστολή των RNAασών. Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος Power Pac 300 (Bio-Rad), σύστημα φωτογράφισης πηκτής αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA (Dolphin-View, Wealtec), φούρνος μικροκυμάτων, πιπέτες όγκου έως 2μL, 10μL, 20μL και 200μL (Eppendorf), ρύγγη πιπετών με φίλτρο όγκου 200 μL ή 20 μL ή 0,5-10 μL (Greiner Bio-One), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 1,5mL απαλλαγμένα από RNAάσες και DNAάσες (Kisker Biotech).

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το mRNA στα πειράματα των μικροσυστοιχιών και της αλυσιδωτής αντιδράσης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) (Ενότητες 3.18 και 3.20) και να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί με ακρίβεια η ποσότητα του απομονωμένου RNA κάθε δείγματος και να ελεγχθεί η ποιότητά του (καθαρότητα και δομική ακεραιότητα). Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA, μετρήθηκε η απορρόφηση του RNA στο εκάστοτε δείγμα στα 260nm στο φασματοφωτόμετρο Nano Drop ND-1000.

Η καθαρότητα του RNA εκτιμάται από τους λόγους απορρόφησης A260/A280 και A260/A230. Η τιμή A260 αντιστοιχεί στην απορρόφηση του RNA στα 260nm, ενώ στα 280nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και οι φαινόλες. Η τιμή A230 αντιστοιχεί στην απορρόφηση στα 230nm όπου απορροφούν οι οργανικές ενώσεις (αλάτια, φαινόλες ή αρωματικά συστατικά γενικότερα, κ.λ.π.). Όταν ο κάθε λόγος A260/A280 και A260/A230 κυμαίνεται μεταξύ 1,9 με 2,1, τότε τα δείγματα RNA είναι επαρκώς καθαρά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω σε αντιδράσεις σύνθεσης cDNA και qRT-PCR και στα πειράματα των μικροσυστοιχιών. Ο μειωμένος λόγος A260/A280 και A260/230 σε δείγματα RNA οφείλεται στην υψηλή απορρόφηση στα 280nm και 230nm, αντίστοιχα, η οποία θα μπορούσε να οφείλεται σε επιμόλυνση με πρωτεΐνες ή φαινόλες. Συνηθέστερα, η θειοκυανική γουανιδίνη που βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο αντιδραστήριο απομόνωσης RNA Trizol μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των λόγων A260/A280 και A260/230.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης και η έλεγχος της καθαρότητας των δειγμάτων RNA έγινε με το φασματοφωτόμετρο Nano Drop ND-1000. Αρχικά, φορτώνεται στη θέση τοποθέτησης του δείγματος 1μl υπερκάθαρο H₂O απαλλαγμένο από DNAάσες και RNάσες, το οποίο αποτελεί το διαλύτη των δειγμάτων RNA που θα ποσοτικοποιηθούν (διάλυμα αναφοράς ή «τυφλό»). Η απορρόφηση του «τυφλού» που μετράται ορίζεται ως μηδενική απορρόφηση. Στη συνέχεια, στη θέση αυτή τοποθετείται 1μl του εκάστοτε δείγματος RNA προς ποσοτικοποίηση, μετράται η συγκέντρωσή του και λαμβάνεται φάσμα απορρόφησης μεταξύ 220-340nm.

Η ποιότητα του RNA που απομονώθηκε ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τα δείγματα RNA προετοιμάζονται για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 500-700ng RNA από το εκάστοτε δείγμα αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης δείγματος 10X σε αναλογία 9:1, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος φόρτωσης στο μίγμα ηλεκτροφόρησης να είναι 1X. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.16.2) και ηλεκτροφόρηση σε σταθερή τάση στα 90V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 0,5X για περίπου 30min. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το ολικό RNA εμφανίζεται με τη μορφή 2 ζωνών που αντιστοιχούν στις δυο ριβοσωμικές υπομονάδες του (rRNA), 28S και 18S. Η ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στην 28S πρέπει να είναι διπλάσια της έντασης της ζώνης της 18S. Όταν, δηλαδή, ο λόγος της 28S ως προς την 18S ριβοσωμική υπομονάδα είναι περίπου ίσος με 2 προς 1, αποτελεί ένδειξη ακέραιου (μη αποικοδομημένου), υψηλής ποιότητας RNA. Εάν το ολικό RNA που απομονώνεται είναι καλής ποιότητας, τότε δεν εμφανίζονται πρόσθετες ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους οι οποίες υποδηλώνουν αποικοδόμηση του RNA. Η απουσία μεγαλομοριακών ζωνών που οφείλονται σε συναπομόνωση γενωμικού DNA αποτελεί ένδειξη καλής ποιότητας RNA. Αντίθετα, η παρουσία μεγάλου μοριακού βάρους ζωνών σε μικρή απόσταση από τα φρεάτια ένθεσης του δείγματος αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης του RNA με γενωμικό DNA.

Στην παρούσα μελέτη, μόνο τα δείγματα RNA με λόγους A₂₆₀/A₂₈₀ και A₂₆₀/A₂₃₀ μεταξύ 1,9-2,1 και λόγο 28S/18S rRNA περίπου ίσο με 2 χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των μικροσυστοιχιών και της qRT-PCR (Ενότητες 3.18 και 3.20).

3.17. Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής του RNA

Υλικά: OligodT εναρκτήριοις αλληλουχίες θυμίνης (εκκινητές) 500μg/ml (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific), αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II Reverse Transcriptase 200U/μl που συνοδεύεται από ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης 5X (First-Strand buffer 5X) με σύσταση: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3 και DTT (0,1M) (Invitrogen/Thermo Fisher

Scientific), νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (DNAάσες και RNAάσες) (Ambion/ Thermo Fisher Scientific), μίγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (“dNTP mix”, 10mM το κάθε ένα) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), αναστολέας RNAασών (RNaseOUT) 40U/μl (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), ρύγχη πιπेटών με φίλτρο όγκου 20 μL ή 0,5-10 μL (Greiner Bio-One), αποστειρωμένα σωληνάκια τύπου erpendorf όγκου 1,5mL απαλλαγμένα από RNAάσες και DNAάσες (Kisker Biotech), PCR θερμοκυκλοποιητής: 9902-Veriti 96-well Thermal Cycler-AB Applied Biosystems

Κατά την αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με μήτρα το ολικό RNA, το οποίο φέρει στο 3ο άκρο του την polyA αλληλουχία (ουρά). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής ως ανάδρομος εκκινητής ο OligodT που αναγνωρίζει ειδικά την αλληλουχία polyA του RNA, καθώς φέρει στο 5ο άκρο του συμπληρωματικές βάσεις θυμίνης (polyT). Η πειραματική διαδικασία για τη σύνθεση cDNA με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl περιγράφεται ως εξής:

Σε κατάλληλο όγκο δείγματος ολικού RNA που περιέχει 1μg RNA προστίθενται 1μl OligodT εκκινητές 500μg/ml (0,5μg), και ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται με υπερκάθαρο H₂O απαλλαγμένο από DNAάσες και RNAάσες μέχρι τα 11μl σε σωληνάριο τύπου erpendorf (η ποσότητα H₂O που προστίθεται υπολογίζεται από τη διαφορά του τελικού όγκου της αντίδρασης (20μl) με το άθροισμα του όγκου των υπόλοιπων προστιθέμενων αντιδραστηρίων). Ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 65°C για 5min στη συσκευή PCR και στη συνέχεια στους 4°C για 2min. Με τη διαδικασία αυτή, θέρμανσης και ψύξης, καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σύνθεσης cDNA. Στη συνέχεια, στην αντίδραση προστίθενται 4μl ρυθμιστικού διαλύματος 5X αντίστροφης μεταγραφάσης, 2μl DTT (τελική συγκέντρωση 0,01M), 1μl από το μίγμα των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (τελική συγκέντρωση 0,5mM το κάθε ένα) και 1μl (40U) αναστολέα RNAασών (RNaseOUT). Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος στους 42°C για 2min στη συσκευή PCR. Τέλος, προστίθεται 1μl (200U) της αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II Reverse Transcriptase, και ακολουθεί επώαση στους 42°C για 50min στη συσκευή PCR, ώστε να δράσει το ένζυμο και να συντεθεί το cDNA. Η αντίδραση μεταγραφής τερματίζεται με επώαση του μίγματος στους 70°C για 15min στη συσκευή PCR, ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και να αποδιαταχθούν τα υβρίδια RNA-cDNA.

Θεωρητικά, από 1μg RNA παράγονται 1μg cDNA, συνεπώς η συγκέντρωση του cDNA είναι 1 μg/20μl, δηλαδή 0,05 μg/μl. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στα πειράματα των μικροσυστοιχιών ή της qRT-PCR (Ενότητες 3.18 και 3.20) ή φυλλάσσεται στους -20 °C.

3.18. Ανάλυση ολικής γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες σε HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3

Υλικά: HAEC κύτταρα (CC-2535, Lonza Walkersville Inc.), βασικό θρεπτικό υλικό EBM-2 (Lonza), πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας HAEC κυττάρων (Lonza), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων DPBS 1X χωρίς CaCl₂ και MgCl₂ (Gibco/Thermo Fisher Scientific), βόειος ορός φτωχός σε λιποπρωτεΐνες (bovine LPDS, bLPDS) (Chemicon International/Merk Millipore), FBS (Gibco/ThermoFischer Scientific), διάλυμα 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης (Gibco/ThermoFischer Scientific), τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 35mm (p60, Nunc/Thermo Fisher Scientific), μικροσυστοιχίες GeneChip™ Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), ρομποτικό σύστημα οργάνων ανάλυσης μικροσυστοιχιών Affymetrix GeneChip™ Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, Thermo Fisher Scientific). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταροκαλλιέργεια των HAEC κυττάρων αναφέρονται στην Ενότητα 3.15.1. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA, τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον έλεγχο ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA, καθώς και για τη σύνθεση cDNA αναφέρονται στις Ενότητες 3.16.1-3.16.2 και 3.17.

Για την αμερόληπτη και σφαιρική αξιολόγηση των γονιδίων και μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δράση της rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 με τεχνική των μικροσυστοιχιών. Αναλυτικότερα, HAEC κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 35mm (p60 τρυβλίο) και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.15.1). Όταν τα κύτταρα είχαν πολλαπλασιαστεί στο 85% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~48h καλλιέργειας), απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και έγινε έκπλυση των κυττάρων (2 φορές) με DPBS 1X 1ml. Κατόπιν, τα κύτταρα επώαστηκαν για 4h σε θρεπτικό υλικό EBM-2 που περιέχει 0,5% (v/v) FBS, 5% (v/v) bLPDS και 1% (v/v) μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης. Μετά από 4h, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και έγινε έκπλυση των κυττάρων (1 φορά) με PBS 1X 1ml. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 12h με rHDL-apoE3 σε τελική συγκέντρωση 250μg/ml ή PBS 1X (δείγμα αναφοράς) σε θρεπτικό υλικό EBM-2 σύστασης

5% (v/v) bLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά. Χρησιμοποιήθηκαν 5 δείγματα για την εκάστοτε θεραπεία, τα οποία προήλθαν από πέντε διαφορετικές καλλιέργειες των HAEC κυττάρων (στην ίδια γενιά) μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 ή PBS 1X (5 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε θεραπεία), προκειμένου να αυξηθεί η βιολογική εγκυρότητα των ευρημάτων. Μετά από 12h, απομονώθηκε το ολικό RNA των κυττάρων που εκτέθηκαν σε rHDL-apoE3 ή PBS 1X με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (βλ. Ενότητα 3.16.1). Η ποσότητα του RNA κάθε δείγματος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 260nm (βλ. Ενότητα 3.16.2). Τα δείγματα RNA (συνολικά 10: 5 δείγματα rHDL-apoE3 και 5 δείγματα PBS) ελέγχθηκαν για την ποιότητά τους (καθαρότητα και δομική ακεραιότητα) (βλ. Ενότητα 3.16.2). Όλα τα δείγματα RNA είχαν λόγους απορρόφησης A260/A280 nm και A260/230 nm μεταξύ 1,9 και 2,1, και επομένως ήταν επαρκώς καθαρά ώστε να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις cDNA σύνθεσης στα πειράματα των μικροσυστοιχιών. Ο λόγος της 28S προς την 18S ριβοσωμική υπομονάδα του RNA (λόγος 28S/18S rRNA) ήταν κοντά στο 2 και για τα 10 δείγματα RNA. Η τιμή αυτή αποτέλεσε ένδειξη ακέραιου (μη αποικοδομημένου) RNA για όλα τα δείγματα. Αυτό το υψηλής ποιότητας RNA (καθαρότητα και ακεραιότητα) για κάθε ένα δείγμα υβριδοποιήθηκε σε μικροσυστοιχίες ανάλυσης ολικής γονιδιακής έκφρασης (Εικόνες 3.3-3.4).

Αναλυτικότερα στα πειράματα των μικροσυστοιχιών, χρησιμοποιήθηκε 1μg RNA από κάθε δείγμα RNA το οποίο μέσα από μία σειρά διαδοχικών αντιδράσεων μετατράπηκε σε cRNA (Εικόνα 3.4). Το cRNA σημάνθηκε με ιχνηθέτη βιοτίνη και το βιοτινυλιωμένο cRNA κατακερματίστηκε τυχαία. Το κατακερματισμένο βιοτινυλιωμένο cRNA υβριδοποιήθηκε στις μικροσυστοιχίες ανάλυσης ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος GeneChip™ Human Gene 1.0 ST Array της Affymetrix (28.869 γονίδια που αντιπροσωπεύονται από 764.885 ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές) (Εικόνα 3.3), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας (Εικόνα 3.4) (https://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/gene_1_0_st_datasheet.pdf).

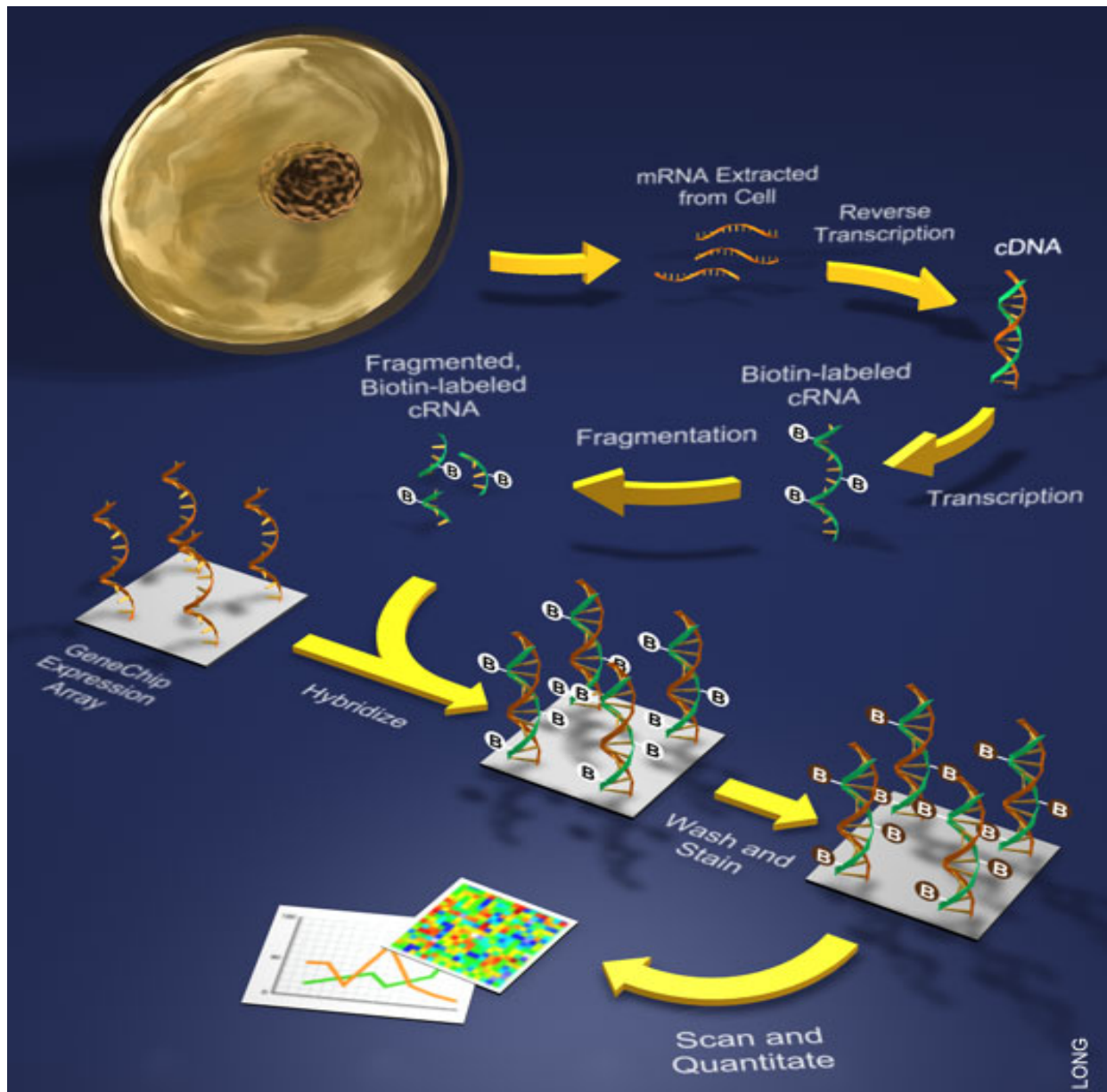
Στην αντίδραση υβριδοποίησης το κατακερματισμένο βιοτινυλιωμένο cRNA υβριδοποιείται στους συμπληρωματικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές της μικροσυστοιχίας. Χρησιμοποιήθηκαν 5 μικροσυστοιχίες για την εκάστοτε θεραπεία, δηλαδή έγινε χρήση 5 πλακιδίων μικροσυστοιχιών στα οποία υβριδοποιήθηκε, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, 1μg RNA από τις 5 διαφορετικές καλλιέργειες των HAEC κυττάρων (στην ίδια γενιά) μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 ή PBS 1X. Τα επαναλαμβανόμενα αυτά πειράματα (5 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία) ήταν απαραίτητα προκειμένου να αυξηθεί η βιολογική εγκυρότητα των ευρημάτων. Ακολούθησε έκπλυση των 10 πλακιδίων

μικροσυστοιχιών και σήμανση του προσδεσμένου στους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές βιοτινυλιωμένου cRNA με φθορίζουσα ουσία που προσκολλάται στη βιοτίνη (στρεπταβιδίνη συζευγμένη με φυκοερυθρίνη). Οι διεργασίες αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του Affymetrix 450 Fluidics station του ρομποτικού συστήματος ανάλυσης μικροσυστοιχιών της Affymetrix (Εικόνα 3.4). Τα πλακίδια, στη συνέχεια, σαρώθηκαν με τη χρήση του συνεστιακού σαρωτή λέιζερ GeneChip Scanner-3000 του ρομποτικού συστήματος, ώστε να καταγραφθούν οι θέσεις και οι εντάσεις των φθοριζόντων εκπομπών, και να εκτιμηθεί ποσοτικά ο βαθμός υβριδισμού του συμπλόκου ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή-επισημασμένου cRNA (Εικόνα 3.4). Τέλος, με τη χρήση πολύπλοκων ειδικών λογισμικών οι μετρήσεις φθορισμού σε κάθε πλακίδιο μετατράπηκαν σε δεδομένα σχετικά με τα γονίδια που εκφράζονται και τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης για το εκάστοτε δείγμα rHDL-apoE3 ή PBS (Εικόνα 3.4).

Οι μικροσυστοιχίες GeneChip™ Human Gene 1.0 ST Array που χρησιμοποιήθηκαν είναι μικρού μεγέθους (1-2 τετραγωνικά εκατοστά) πλακίδια οι οποίες αξιολογούν αλλαγές έκφρασης του συνόλου του ανθρώπινου γονιδιώματος (28.869 γονίδια) (Εικόνα 3.3). Κάθε ένα από τα 28.869 γονίδια αντιπροσωπεύεται στη μικροσυστοιχία από περίπου 26 ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές (ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές) που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες διάσπαρτες κατά μήκος του γονιδίου, εξασφαλίζοντας έτσι μία ακριβή και ολοκληρωμένη εικόνα του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπου. Ο συνολικός αριθμός των διαφορετικών σε κάθε μικροσυστοιχία ανιχνευτών είναι 764.885 ανιχνευτές (https://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/gene_1_0_st_datasheet.pdf) [465].



Εικόνα 3.3: Μικροσυστοιχία GeneChip™ Human Gene 1.0 ST Array ανάλυσης ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος της εταιρείας Affymetrix που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων σήμανσης και υβριδοποίησης του RNA στη μικροσυστοιχία GeneChip™ Human Gene 1.0 ST Array της εταιρείας Affymetrix: 1) Απομόνωση ολικού ώριμου RNA από τα υπό μελέτη δείγματα (κύτταρα ή ιστούς) και αξιολόγηση της ποιότητάς του. 2) Σύνθεση δίκλωνου cDNA: Μετατροπή του RNA σε δίκλωνο cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. 3) Μεταγραφή του cDNA σε cRNA και βιοτινυλίωση του cRNA: το cDNA μεταγράφεται σε RNA in vitro (cRNA) και το συμπληρωματικό RNA (cRNA) σημαίνεται με ιχνηθέτη βιοτίνη. Η ποσότητα και καθαρότητα του βιοτινυλιωμένου cRNA προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. 4) Κατακερματισμός του βιοτινυλιωμένου cRNA: Το βιοτινυλιωμένο cRNA κατακερματίζεται με χημικές μεθόδους σε τυχαίες αλληλουχίες μήκους 30-400 bp. 5) Υβριδοποίηση του κατακερματισμένου βιοτινυλιωμένου cRNA στη μικροσυστοιχία: Το κατακερματισμένο βιοτινυλιωμένο cRNA

υβριδοποιείται στους συμπληρωματικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές της μικροσυστοιχίας. Η υβριδοποίηση διεξάγεται για 16h στους 45°C. 6) Έκπλυση της μικροσυστοιχίας και χρώση της με φθορίζουσα ουσία χρησιμοποιώντας το Affymetrix 450 Fluidics station του ρομποτικού συστήματος ανάλυσης μικροσυστοιχιών: Έκπλυση της μικροσυστοιχίας ώστε να απομακρυνθεί το cRNA που δεν έχει υβριδοποιηθεί σε συμπληρωματικό του ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή. Το προσδεδεμένο στη μικροσυστοιχία βιοτινυλιωμένο cRNA σημαίνεται με φθορισμό με τη χρήση φθορίζουσας ουσίας (στρεπταβιδίνη συζευγμένη με φυκοερυθρίνη) που συνδέεται στη βιοτίνη. 7) Οπτική σάρωση της μικροσυστοιχίας και ποσοτικοποίηση: Κάθε επισημασμένο cRNA προσδεδεμένο στο συμπληρωματικό του ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή διαγείρεται χρησιμοποιώντας το συνεστιακό σαρωτή λέιζερ GeneChip Scanner-3000 του ρομποτικού συστήματος, και καταγράφονται οι θέσεις και οι εντάσεις των φθορίζοντων εκπομπών (ποσοτική εκτίμηση του βαθμού υβριδισμού ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή-επισημασμένου cRNA). Οι μετρήσεις φθορισμού στη μικροσυστοιχία μετατρέπονται μέσω ειδικών λογισμικών σε δεδομένα σχετικά με τα γονίδια που εκφράζονται και τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης για το εκάστοτε δείγμα (https://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/gene_1_0_st_datasheet.pdf).

3.19. Βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών και βιολογική ερμηνεία των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης (Data Mining)

Υλικά: Λογισμικό Partek Genomics Suite (Partek Inc., Saint Louis, MO, USA), λογισμικό GeneCodis (Gene annotations co-occurrence discovery, Πανεπιστήμιο της Μασαχουσέτης), λογισμικό Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Qiagen)

3.19.1. Βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών

Η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών (raw data) που προέκυψαν από τα 10 υπό μελέτη δείγματα, 5 δείγματα που εκτέθηκαν στην rHDL-apoE3 και 5 δείγματα αναφοράς που εκτέθηκαν σε PBS (Ενότητα 3.18), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Partek Genomics Suite. Εφαρμόστηκε η ανάλυση RMA (Robust Multi-chip Analysis) για την κανονικοποίηση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών (αρχεία τύπου Affymetrix CEL) [466]. Η Ανάλυση Ισχύος (Power Analysis) εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του ελάχιστου μεγέθους δείγματος που απαιτείται για την ανίχνευση διαφορετικών προφίλ γονιδιακής έκφρασης με στατιστική αξιοπιστία, και για την επιλογή του κατάλληλου ορίου στο λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης (Fold Change (FC) threshold)

[467]. Ακολούθησαν ειδικές συσχετίσεις ομαδοποίησης και ιεράρχησης των προφίλ γονιδιακής έκφρασης κάθε δείγματος [466]. Μεταξύ αυτών πραγματοποιήθηκε η ανάλυση PCA (Principal Component Analysis) χρησιμοποιώντας το σύνολο των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών για την ανίχνευση κυρίαρχων μοτίβων γονιδιακής έκφρασης (διακριτές αλλαγές σε επίπεδο ολικής γονιδιακής έκφρασης) μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων, τα HAEC κύτταρα που εκτέθηκαν στην rHDL-apoE3 και τα κύτταρα αναφοράς PBS. Η ομαδοποίηση των δειγμάτων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 και των δειγμάτων αναφοράς PBS προέκυψε από τη σύγκριση των προφίλ ολικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων [468]. Οι στατιστικώς σημαντικές αλλαγές γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των ομάδων δειγμάτων προσδιορίστηκαν εφαρμόζοντας pairwise Welch t-τεστς (t-statistic, P-value και FDR q-value), με τη χρήση αυστηρών κριτηρίων ανάλυσης: FC $\geq \pm 2,00$ και FDR $\leq 0,05$. Ως θετικός ή αρνητικός λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης (FC, Fold Change) ορίζεται ο λόγος της μέσης έκφρασης ενός γονιδίου μετά από έκθεση των κυττάρων στην rHDL-apoE3 προς την έκφρασή του στα κύτταρα αναφοράς PBS (n = 5 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία). Το FDR (False Discovery Rate) είναι ο τρόπος υπολογισμού της πιθανότητας οι συγκεκριμένες μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης να έχουν προκύψει τυχαία και να μην αποτελούν συστηματικό βιολογικό εύρημα. Τέλος, εφαρμόστηκε η Ιεραρχική Ομαδοποίηση των προφίλ γονιδιακής έκφρασης (Hierarchical Clustering) των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων rHDL-apoE3 και PBS [469], προκειμένου να εντοπιστούν τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, και κατ' επέκταση, τα διαφορετικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων.

3.19.2. Εξόρυξη βιολογικών δεδομένων από τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών και βιολογική ερμηνεία των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης (Data Mining)

3.19.2.1. Gene Ontology (GO) ανάλυση των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3

Τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα μετάγραφα των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3, τα οποία προέκυψαν από λεπτομερή βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών (Ενότητα 3.19.1), κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την τοπολογία των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών στο κύτταρο (Κυτταρική Τοπολογία, Cellular Component, CC) εφαρμόζοντας την ανάλυση Gene Ontology (GO) με τη χρήση του λογισμικού GeneCodis (Gene annotations co-occurrence discovery, (<https://genecodis.genyo.es/>) [470, 471]. Η λίστα των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων

γονιδίων με το επίσημο σύμβολο (Entrez Gene Symbol) και τον αριθμό ταυτότητας (Entrez Gene ID, gene identifier) “φορτώθηκε” σε μορφή Text αρχείου στο λογισμικό GeneCodis. Κάθε κατηγορία γονιδίων που προκύπτει από τη GO ομαδοποίηση χαρακτηρίζεται από την τιμή *P*-value (βαθμός σημαντικότητας), η οποία εκφράζει την πιθανότητα η κατηγοριοποίηση ενός γονιδίου σε μία συγκεκριμένη κατηγορία να έχει προκύψει τυχαία, δηλαδή να μην είναι συστηματικό βιολογικό εύρημα [471]. Όταν η τιμή *P*-value είναι μικρή, υπάρχει μικρή πιθανότητα η κατηγοριοποίηση ενός γονιδίου να είναι τυχαίο προϊόν. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $P \leq 0,05$, και όσο μικρότερη του 0,05 είναι η τιμή του *P*-value τόσο πιο στατιστικώς σημαντική θεωρείται αυτή η κατηγοριοποίηση [472]. Η τιμή του *P*-value υπολογίστηκε με τα στατιστικά τεστ Υπεργεωμετρική Κατανομή και το Chi-Square Test του λογισμικού του GeneCodis [470]. Η GO ομαδοποίηση των γονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά κοινώς αποδεκτά επίπεδα αυξανόμενης «λεπτομέρειας» που έχουν αριθμηθεί από 1 έως 11 [471] [473]. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, η GO ομαδοποίηση των αλλαγμένων γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο 7 επιλέγοντας ως ελάχιστο αριθμό γονιδίων/κατηγορία τα τρία γονίδια.

3.19.2.2. IPA ανάλυση

3.19.2.2.1. Η «Κεντρική Ανάλυση» του λογισμικού IPA

Τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα μετάγραφα των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αποΕ3, τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών (Ενότητα 3.19.1), υποβλήθηκαν σε λεπτομερή βιοπληροφορική ανάλυση για τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Data Mining). Η βιολογική ερμηνεία των παρατηρούμενων αλλαγών γονιδιακής έκφρασης έγινε με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης τελευταίας τεχνολογίας Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/next-generation-sequencing/informatics-and-data/interpretation-content-databases/ingenuity-pathway-analysis/>). Το λογισμικό IPA παρέχει σε επεξεργασμένη μορφή ένα μεγάλο εύρος ερευνητικών ευρημάτων δημοσιευμένων σε έγκυρα επιστημονικά περιοδικά που οργανώνονται στη βάση δεδομένων του Ingenuity (Ingenuity Knowledge Base). Τα ευρήματα της IPA ανάλυσης που παρουσιάζονται προέρχονται από πειραματικά αποτελέσματα των πιο πρόσφατων επιστημονικών δημοσιεύσεων και αφορούν, μεταξύ άλλων, τις βιολογικές και μοριακές λειτουργίες των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων, τα εδραιωμένα μοριακά μονοπάτια και τα δίκτυα στα οποία συμμετέχουν οι

πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα μετάγραφα (άμεσες/έμμεσες αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών), τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδιακών/πρωτεϊνικών δικτύων που σχηματίζονται από τα γονίδια επιλογής του χρήστη, καθώς και τους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές που ενδέχεται να ρυθμίζουν την έκφραση των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων [474].

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η λίστα των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων μεταγράφων με το επίσημο σύμβολο (Entrez Gene Symbol), τον αριθμό ταυτότητας (Entrez Gene ID, gene identifier), και το λόγο αλλαγής έκφρασης (FC, Fold Change) που αντιστοιχεί σε κάθε μετάγραφο “φορτώθηκε” σε μορφή Microsoft Office Excel στο λογισμικό IPA χρησιμοποιώντας ειδικά επιλεγμένες συνθήκες ανάλυσης (Settings) (Πίνακας 3.4). Χρησιμοποιήθηκε η «Κεντρική Ανάλυση» («Core Analysis»), η οποία κατηγοριοποιεί τα γονίδια με αλλαγμένη έκφραση με βάση τις βιολογικές και μοριακές τους λειτουργίες («Ανάλυση Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών») (Ενότητα 3.19.2.2.2), και παρέχει πληροφορίες/διαγράμματα για τη μεταξύ τους βιολογική σχέση, τη θέση τους σε εδραιωμένα γνωστά μοριακά μονοπάτια («Ανάλυση Εδραιωμένων Μονοπατιών»), καθώς και για τα δίκτυα («Ανάλυση Δικτύων») στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά (Ενότητα 3.19.2.2.3). Επιπλέον, η «Κεντρική Ανάλυση» κάνει μία πρόβλεψη σχετικά με τους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές («Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών») που ενδέχεται να συμμετέχουν στη ρυθμίση της έκφρασης των αλλαγμένων γονιδίων (Ενότητα 3.19.2.2.4). Τα αποτελέσματα κάθε κατηγορίας μπορούν να εξαχθούν και να αποθηκευτούν σαν έγγραφο τύπου Microsoft Office Excel και οι εικόνες/διαγράμματα σαν αρχεία τύπου jpg. Στις Ενότητες 3.19.2.2.2 - 3.19.2.2.4 περιγράφονται αναλυτικότερα οι διαφορετικές αναλύσεις της «Κεντρικής Ανάλυσης» του λογισμικού IPA με βάση το βοηθητικό εγχειρίδιο IPA που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Πίνακας 3.4: Οι επιλεγμένες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 με τη χρήση της «Κεντρική Ανάλυσης» του λογισμικού IPA.

| Συνθήκες Κεντρικής Ανάλυσης IPA | |
|---|--|
| Περιοχή Αναφοράς (Reference Set): | Βάση γνώσεων του Ingenuity (“Ingenuity Knowledge Base”, γονίδια μόνο) |
| Να συμπεριλαμβάνονται οι αλληλεπιδράσεις: | Άμεσες και έμμεσες αλληλεπιδράσεις |
| Πηγές Δεδομένων: | Όλες |
| Να συμπεριλαμβάνονται μόνο τα ευρήματα που προέρχονται από: | Πειραματικά αποτελέσματα |
| Να συμπεριλαμβάνονται τα ευρήματα που αφορούν τα είδη: | Όλα τα είδη (π.χ. άνθρωπος, ποντίκι, αρουραίος, κουνέλι, κλπ) |
| Να συμπεριλαμβάνονται τα ευρήματα από: | Όλους τους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές |
| Να συμπεριλαμβάνονται ευρήματα που αφορούν: | Τον άγριο τύπο του γονιδίου ή του προϊόντος του και τις μεταλλαγμένες μορφές του |
| Να εμφανίζονται τα Δίκτυα: | Μοριακά Δίκτυα αλληλεπιδράσεων (άμεσες και έμμεσες) και συσχετίσεων |
| Τα μοριακά Δίκτυα να περιλαμβάνουν: | Ενδογενείς Μεταβολίτες και να εμφανίζονται μέχρι 25 Δίκτυα σε κάθε ανάλυση |
| Σε κάθε μοριακό δίκτυο να συμπεριλαμβάνονται: | Μέχρι και 35 πρωτεΐνες |
| Προαιρετικές Αναλύσεις: | My Pathways My List |

3.19.2.2.2. Ανάλυση «Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών» του λογισμικού IPA

Η ανάλυση «Βιολογικές και Μοριακές Λειτουργίες» («Ανάλυση Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών», «Biological and Molecular Function Analysis») της “Κεντρικής Ανάλυσης” IPA προσδιορίζει ποιες από τις λειτουργίες που οργανώνονται στη βάση δεδομένων του IPA σχετίζονται περισσότερο με τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα μετάγραφα της μελέτης. Για τον εντοπισμό των πιο στατιστικά σημαντικών λειτουργιών στην κάθε μελέτη, η ανάλυση IPA συγκρίνει τις λειτουργίες που σχετίζονται με τα “Function Eligible μόρια” στη λίστα επιλογής του χρήστη με τις λειτουργίες οι οποίες σχετίζονται με όλα τα μόρια που

περιλαμβάνονται στην περιοχή αναφοράς “Reference Set”. Με τον όρο “Function Eligible μόρια” ορίζονται τα μόρια της λίστας επιλογής του χρήστη που πληρούν τα εξής κριτήρια: 1) θεωρούνται ως ιδιαίτερου ενδιαφέροντος μετά από σύγκριση των λόγων έκφρασης των μορίων αυτών με τους λόγους έκφρασης των άλλων μορίων της λίστας και 2) κατηγοριοποιούνται τουλάχιστον σε μία λειτουργική κατηγορία της βάσης δεδομένων του Ingenuity “Ingenuity Knowledge Base”.

Η κατηγοριοποίηση των γονιδίων με βάση τις βιολογικές ή μοριακές λειτουργίες δε γίνεται μόνο με τη χρήση της βάσης δεδομένων του IPA αλλά και άλλων βάσεων δεδομένων, όπως Entrez Gene, Gene Ontology (GO) και Swiss-Prot, με αποτέλεσμα η λειτουργική ανάλυση IPA να παρέχει μία πιο πλήρη και ολοκληρωμένη εικόνα λειτουργικής ανάλυσης σε σχέση με άλλα λογισμικά. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη, η περαιτέρω ανάλυση των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από επώαση με την rHDL-αροΕ3 (Ενότητα 3.19.1) έγινε με βάση την κατηγοριοποίησή τους στις βιολογικές και μοριακές λειτουργικές κατηγορίες της IPA ανάλυσης και όχι με βάση τη λειτουργική GO ανάλυση (Ενότητα 3.19.2.1).

Κάθε λειτουργική κατηγορία της IPA ανάλυσης συνοδεύεται από έναν αριθμό γονιδίων που κατηγοριοποιούνται σε αυτήν και χαρακτηρίζεται από την τιμή *P*-value (βαθμός σημαντικότητας). Η τιμή *P*-value έκφραζει την πιθανότητα η κατηγοριοποίηση των γονιδίων στην εκάστοτε βιολογική ή μοριακή λειτουργία να έχει προκύψει τυχαία και υπολογίζεται με το the right-tailed Fisher’s Exact Test λαμβάνοντας υπόψη τα εξής: 1) τον αριθμό των “Function Eligible μορίων” που συμμετέχουν στη συγκεκριμένη λειτουργία, 2) το συνολικό αριθμό των μορίων στη βάση δεδομένων του Ingenuity (“Ingenuity Knowledge Base μόρια”) τα οποία με βάση την επιστημονική βιβλιογραφία σχετίζονται με τη συγκεκριμένη λειτουργία, 3) το συνολικό αριθμό των “Function Eligible μορίων” που συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση «Βιολογικές και Μοριακές Λειτουργίες» και 4) το συνολικό αριθμό γονιδίων που περιλαμβάνονται στην περιοχή αναφοράς “Reference Set”. Στο Fisher’s Exact Test, μόνο οι λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατηγοριοποιούνται περισσότερα γονίδια (“Function Eligible μόρια”) από αυτά που αναμένονται να έχουν προκύψει τυχαία, θεωρούνται στατιστικά σημαντικές (“right-tailed” *P*-values). Αντίθετα, οι λειτουργίες στις οποίες αντιστοιχούν σημαντικά λιγότερα γονίδια (“Function Eligible μόρια”) από αυτά που αναμένονται να έχουν προκύψει τυχαία (“left-tailed” *P*-values) δεν παρουσιάζονται στην ανάλυση. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας στην ανάλυση «Βιολογικές και Μοριακές Λειτουργίες» ορίζεται το $P \leq 0,05$.

3.19.2.2.3. «Ανάλυση Δικτύων» του λογισμικού IPA

Η «Ανάλυση Δικτύων» της “Κεντρικής Ανάλυσης” IPA παρέχει πληροφορίες/διαγράμματα για τις άμεσες/έμμεσες αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα υπό μελέτη στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια τόσο μεταξύ τους όσο και με όλες τις άλλες πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων του Ingenuity (“Ingenuity Knowledge Base”). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αναπαριστώνται με τη μορφή δικτύων. Η μελέτη ενός δικτύου επιτρέπει την κατανόηση των συσχετίσεων ανάμεσα στα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια και στα υπόλοιπα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχηματίζουν το δίκτυο, και κατά συνέπεια, μεταξύ των μοριακών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται. Για κάθε ένα δίκτυο καταγράφεται: 1) ο αριθμός των υπό μελέτη αλλαγμένων γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό, 2) τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που περιέχονται στο εκάστοτε δίκτυο, 3) τα γονίδια που δεν αλλάζουν έκφραση και κωδικοποιούν για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του δικτύου με τις οποίες σχετίζονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα αλλαγμένα γονίδια και 4) οι στατιστικώς σημαντικότερες βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών του δικτύου. Με τη χρήση του Fischer’s exact Τεστ υπολογίζεται η πιθανότητα η εκάστοτε βιολογική λειτουργία να αντιστοιχήθηκε στο δίκτυο τυχαία, και ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται το $P \leq 0,05$.

Κάθε δίκτυο χαρακτηρίζεται από μία τιμή Σκορ, η οποία βασίζεται στην Υπεργεωμετρική κατανομή, υπολογίζεται από το Fischer’s exact Τεστ και είναι ο αρνητικός λογάριθμος του P -value. Η τιμή σκορ δεν αποτελεί ένδειξη της βιολογικής σημασίας ενός δικτύου, αλλά υπολογίζει τη μαθηματική σχέση μεταξύ ενός δικτύου και των “Network Eligible μορίων” της λίστας επιλογής του χρήστη. Με τον όρο “Network Eligible μόρια” ορίζονται τα μόρια της λίστας επιλογής του χρήστη που πληρούν τα εξής κριτήρια: 1) θεωρούνται ως ιδιαίτερου ενδιαφέροντος μετά από σύγκριση των λόγων έκφρασης των μορίων αυτών με τους λόγους έκφρασης των άλλων μορίων της λίστας και 2) αλληλεπιδρούν με “Ingenuity Knowledge Base” μόρια της βάσης δεδομένων του Ingenuity. Η τιμή Σκορ προκύπτει λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των “Network Eligible μορίων” που συμμετέχουν στο δίκτυο και το μέγεθός του, καθώς και το συνολικό αριθμό των “Network Eligible μορίων” που αναλύονται, αλλά και το συνολικό αριθμό των “Ingenuity Knowledge Base μορίων” στη βάση δεδομένων του Ingenuity τα οποία θα μπορούσαν, ενδεχομένως, να συμπεριληφθούν στο δίκτυο.

3.19.2.2.4. Ανάλυση πρόβλεψης μεταγραφικών ρυθμιστών («Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών») του λογισμικού IPA

Με βάση την ανάλυση «Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών» («Upstream Regulator Analysis») της “Κεντρικής Ανάλυσης” IPA γίνεται μία πρόβλεψη σχετικά με τους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές που θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των υπό μελέτη στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων. Η ανάλυση αυτή εντοπίζει τους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές που θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις παρατηρούμενες αλλαγές έκφρασης των γονιδίων στην λίστα επιλογής του χρήστη. Η «Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών» βασίζεται στις αναμενόμενες επιδράσεις του κάθε μεταγραφικού παράγοντα/μεταγραφικού ρυθμιστή στα γονίδια-στόχους της βάσης δεδομένων “Ingenuity Knowledge Base”. Οι επιδράσεις αυτές προέρχονται από την επιστημονική βιβλιογραφία και αφορούν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων από τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα/μεταγραφικό ρυθμιστή (επαγωγή έκφρασης ή ενεργοποίηση μεταγραφής του γονιδίου-στόχου, καταστολή έκφρασης ή καταστολή μεταγραφής του γονιδίου-στόχου). Η συγκεκριμένη ανάλυση εξετάζει πόσα από τα γνωστά γονίδια-στόχους κάθε μεταγραφικού παράγοντα/μεταγραφικού ρυθμιστή εμφανίζονται ως στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα στη λίστη επιλογής του χρήστη.

Στην ανάλυση αυτή, γίνεται, επίσης, σύγκριση μεταξύ της παρατηρούμενης αύξησης ή μείωσης της έκφρασης ενός γονιδίου με την αναμενόμενη ρύθμιση της έκφρασής του από τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα/μεταγραφικό ρυθμιστή, η οποία έχει προκύψει από την επιστημονική βιβλιογραφία. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται πρόβλεψη των πιθανών μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών που ενδεχομένως να ευθύνονται για τις παρατηρούμενες αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων. Στους προβλεπόμενους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές συμπεριλαμβάνονται μεταγραφικοί παράγοντες, ενδοκυτταρικά σήματα φωσφορυλίωσης, πυρηνικοί υποδοχείς, κινάσες, microRNAs και άλλοι τύποι μορίων που ρυθμίζουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο τη γονιδιακή έκφραση. Κάθε μεταγραφικός παράγοντας/μεταγραφικός ρυθμιστής συμβάλλει στη ρύθμιση της έκφρασης περισσότερων του ενός στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζει και ο ίδιος αλλαγμένη έκφραση.

Εκτός από την πρόβλεψη των μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των υπό μελέτη αλλαγμένων γονιδίων, η «Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών» προβλέπει εάν οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες/ρυθμιστές είναι πιθανόν να ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται. Η πρόβλεψη της ενεργοποίησης ή της

καταστολής του εκάστοτε μεταγραφικού παράγοντα/μεταγραφικού ρυθμιστή βασίζεται στο σύνολο των παρατηρούμενων αλλαγών έκφρασης των γονιδίων-στόχων του. Στην πρόβλεψη αυτή, λαμβάνονται, επίσης, υπόψη η αναμενόμενη ρύθμιση της έκφρασης του κάθε γονιδίου-στόχου από τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα/μεταγραφικό ρυθμιστή με βάση την επιστημονική βιβλιογραφία.

Στην «Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών», για κάθε μεταγραφικό παράγοντα/μεταγραφικό ρυθμιστή υπολογίζεται η τιμή *P*-value επικάλυψης (overlap *P*-value). Η τιμή *P*-value επικάλυψης υπολογίζει εάν υπάρχει μία στατιστικώς σημαντική επικάλυψη μεταξύ των υπό μελέτη αλλαγμένων γονιδίων και των γονιδίων-στόχων των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα/μεταγραφικό ρυθμιστή. Η τιμή *P*-value επικάλυψης υπολογίζεται από το Fischer's exact Test, και ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται γενικά το *P*-value < 0,01. Με βάση την τιμή *P*-value επικάλυψης, η «Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών» εντοπίζει τους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές που θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις παρατηρούμενες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης, και κατ' επέκταση, ενδεχομένως να ευθύνονται για αυτές.

3.19.2.3. Ανάλυση γονιδίων με τη διεθνή βάση δεδομένων του PubMed

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην επίδραση της rHDL-apoE3 στα γονίδια των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με την κυτταρική κίνηση, την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό θάνατο και την επιβίωση, καθώς και τον κυτταρικό κύκλο. Η επιλογή των συγκεκριμένων λειτουργιών βασίστηκε στα αποτελέσματα της ανάλυσης «Βιολογικές και Μοριακές Λειτουργίες» της “Κεντρικής Ανάλυσης” του λογισμικού IPA (βλ. Ενότητα 4.3.1), καθώς και στο επιστημονικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν. Ειδικότερα, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, καθώς και η απόπτωση και η επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι λειτουργίες σημαντικές για τη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας του αρτηριακού τοιχώματος, την επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό [214] [220]. Με τον τρόπο αυτό, οι εν λόγω λειτουργίες συμβάλλουν στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ή ακόμη και στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης [212] [214, 215]. Οι λόγοι για τους οποίους η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη των λειτουργιών αυτών αναφέρονται, αναλυτικότερα, στην Ενότητα 4.3.1 των Αποτελεσμάτων. Προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος η επίδραση της rHDL-apoE3 στη μετανάστευση, στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην απόπτωση και στην επιβίωση, καθώς και στον

κυτταρικό κύκλο των HAEC κυττάρων, και να χαρακτηριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της σε κυτταρικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε ενδελεχής ανάλυση των αλλαγμένων γονιδίων που σχετίζονται με τις λειτουργίες αυτές μέσω της διεθνής βάσης δεδομένων PubMed της NCBI (Data Mining). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε εκτενής αναζήτηση της διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας για τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 τα οποία ομαδοποιήθηκαν μέσω της ανάλυσης IPA στις λειτουργικές κατηγορίες: “Κυτταρική Κίνηση”, “Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός”, “Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση” και “Κυτταρικός Κύκλος” (Ενότητα 4.2.3) (Πίνακας 4.1). Η αναζήτηση της επιστημονικής βιβλιογραφίας (ερευνητικά άρθρα) που σχετίζεται με τις λειτουργίες αυτές για το σύνολο των 213 γονιδίων έγινε με τη χρήση επιλεγμένων λέξεων-«κλειδιών». Αναλυτικότερα, για τη λειτουργική κατηγορία “Κυτταρική Κίνηση” χρησιμοποιήθηκε το επίσημο πλήρες όνομα ή σύμβολο για κάθε ένα από τα γονίδια της κατηγορίας μαζί με τη φράση «μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων». Όσον αφορά τη λειτουργική κατηγορία γονιδίων “Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός”, χρησιμοποιήθηκε το επίσημο πλήρες όνομα ή σύμβολο για κάθε ένα από τα γονίδια της κατηγορίας μαζί με τη φράση «πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων» ή/και «διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων». Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική αναζήτηση για κάθε ένα από τα γονίδια της λειτουργικής κατηγορίας “Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση” χρησιμοποιώντας το επίσημο πλήρες όνομα ή σύμβολο του εκάστοτε γονιδίου μαζί με τη φράση «κυτταρικός θάνατος ενδοθηλιακών κυττάρων» ή «απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων» ή/και «επιβίωση ενδοθηλιακών κυττάρων». Τέλος, για τη λειτουργική κατηγορία “Κυτταρικός Κύκλος” χρησιμοποιήθηκε το επίσημο πλήρες όνομα ή σύμβολο για κάθε ένα από τα γονίδια της κατηγορίας μαζί με τη φράση «κυτταρικός κύκλος ενδοθηλιακών κυττάρων» ή/και «G1/S μεταβατική φάση του κυτταρικού κύκλου στα ενδοθηλιακά κύτταρα» ή/και «G2/M μεταβατική φάση του κυτταρικού κύκλου στα ενδοθηλιακά κύτταρα».

Σε περιπτώσεις που η βιβλιογραφική αναζήτηση με τους παραπάνω συνδυασμούς λέξεων-κλειδιών για τα γονίδια των υπό μελέτη βιολογικών και μοριακών λειτουργιών δεν εμφάνιζε αποτελέσματα, το επίσημο πλήρες όνομα ή σύμβολο του εκάστοτε γονιδίου αντικαθιστούνταν με τα συνώνυμά του, τα οποία παρέχονται από τη διεθνή βάση δεδομένων Entrez Gene, και επαναλαμβάνονταν η βιβλιογραφική αναζήτηση, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Όταν η βιβλιογραφική αναζήτηση εμφάνιζε αριθμό δημοσιεύσεων που ξεπερνούσε τις 50 χρησιμοποιήθηκε ως περιορισμός αναζήτησης η προϋπόθεση οι λέξεις-κλειδιά να εμφανίζονται υποχρεωτικά στον τίτλο ή/και στην

περίληψη του ερευνητικού άρθρου. Με την εφαρμογή του συγκεκριμένου φίλτρου, η βιβλιογραφική αναζήτηση ήταν πιο ειδική και προέκυπταν οι πιο αντιπροσωπευτικές δημοσιεύσεις. Οι δημοσιεύσεις που τελικώς μελετήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση το περιεχόμενό τους σε μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι σχετίζονταν με την υπό μελέτη βιολογική/μοριακή λειτουργία για το εκάστοτε γονίδιο. Δεν εφαρμόστηκε περιορισμός ως προς το έτος της δημοσίευσης, ώστε να μην παραληφθούν σημαντικές πληροφορίες που αφορούν σε μοριακούς μηχανισμούς. Για κάθε ένα γονίδιο μελετήθηκαν κατά μέσο όρο 10 δημοσιεύσεις για την εκάστοτε βιολογική/μοριακή λειτουργία, οι οποίες αναφέρονταν σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνεπώς, μελετήθηκαν συνολικά άνω των 2.500 δημοσιεύσεων.

3.20. Πειράματα μεγάλης κλίμακας ποσοτικής PCR σε HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 για την επιβεβαίωση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών

Υλικά: Αντιδραστήριο απομόνωσης ολικού RNA Trizol (Ambion/ Thermo Fisher Scientific), OligodT εναρκτήριοις αλληλουχίες θυμίνης (εκκινητές) 500μg/ml (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), μίγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (“dNTP mix”, 10mM το κάθε ένα) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II Reverse Transcriptase 200U/μl που συνοδεύεται από ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης 5X (First-Strand buffer 5X) με σύσταση: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3 και DTT (0,1M) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific). TaqMan ανιχνευτές (TaqMan probes, Thermo Fisher Scientific) (Πίνακας 3.5), BioMark 96.96 Dynamic Array Chips (Fluidigm Biomark, San Francisco, CA, USA). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του ολικού RNA, τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον έλεγχο ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA, καθώς και για τη σύνθεση cDNA αναφέρονται στις Ενότητες 3.16.1-3.16.2 και 3.17. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των HAEC κυττάρων σε συνθήκες στέρησης ορού και την επώαση των κυττάρων με την rHDL-apoE3 αναφέρονται στην Ενότητα 3.18.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι αλλαγές έκφρασης οι οποίες προσδιορίστηκαν με τις μικροσυστοιχίες σε 31 επιλεγμένα γονίδια με σημαντικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα (βλ. Ενότητα 4.7 και Πίνακα 4.7), εφαρμόστηκαν αναλύσεις μεγάλης κλίμακας ποσοτικής RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (high-throughput quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR) (Πίνακας 3.). Αναλυτικότερα, HAEC κύτταρα επώαστηκαν για 4h σε συνθήκες στέρησης ορού και κατόπιν εκτέθηκαν για 12h σε rHDL-apoE3 (250 μg/ml) ή PBS 1X (δείγμα

αναφοράς) σε θρεπτικό υλικό EBM-2 σύστασης 5% (v/v) bLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.18. Χρησιμοποιήθηκαν 5 δείγματα για την εκάστοτε θεραπεία, τα οποία προήλθαν από πέντε διαφορετικές καλλιέργειες των HAEC κυττάρων (στην ίδια γενιά) μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 ή PBS 1X (5 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε θεραπεία). Μετά από 12h, απομονώθηκε το ολικό RNA των κυττάρων που εκτέθηκαν σε rHDL-apoE3 ή PBS 1X με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Ενότητα 3.16.1). Η ποσότητα του RNA κάθε δείγματος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά και το σύνολο των 10 δειγμάτων RNA (5 δείγματα rHDL-apoE3 και 5 δείγματα PBS) αξιολογήθηκαν για την ποιότητά τους (καθαρότητα και δομική ακεραιότητα) (Ενότητα 3.16.2). Όλα τα δείγματα RNA είχαν λόγους απορρόφησης A260/A280 και A260/230 μεταξύ 1,9-2,1 (ένδειξη επαρκώς καθαρού RNA) και λόγο 28S/18S rRNA περίπου ίσο με 2 (ένδειξη ακέραιου (μη αποικοδομημένου) RNA). Τα υψηλής ποιότητας δείγματα RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση cDNA με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II Reverse Transcriptase, των “oligodT εναρκτήριων αλληλουχιών θυμίνες” (εκκινητές) και των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Ενότητα 3.17). Στη συνέχεια, το cDNA χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή μεγάλης κλίμακας qRT-PCR χρησιμοποιώντας την τεχνολογία BioMark 96.96 Dynamic Array Chips, σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Οι TaqMan ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση με qRT-PCR των 31 υπό μελέτη γονιδίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5. Σε κάθε αντίδραση qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 3.5). Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων των αντιδράσεων qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της συγκριτικής διαφοράς κύκλων (comparative C_T) [475], και οι τιμές $\Delta\Delta C_T$ υπολογίστηκαν σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $P \leq 0,05$.

Πίνακας 3.5: Στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια που προέκυψαν από τις μικροσυστοιχίες (31 γονίδια) των οποίων οι αλλαγές έκφρασης αναλύθηκαν με qRT-PCR στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3. Για κάθε ένα γονίδιο παρουσιάζεται ο TaqMan ανιχνευτής (Thermo Fisher Scientific) που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση qRT-PCR. Το γονίδιο αναφοράς GAPDH χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα 31 αυτά επιλεγμένα γονίδια κατηγοριοποιούνται με βάση την κυτταρική τοπολογία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά. Τα γονίδια αυτά παίζουν βασικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού,

διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης των ΗΑΕC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Η κατηγοριοποίηση των γονιδίων αυτών με βάση τη συμμετοχή τους στα προαναφερόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.7 της Ενότητας 4.7.

| Γονίδια που κωδικοποιούν για εκκρινόμενες πρωτεΐνες | | Γονίδια που κωδικοποιούν για μεμβρανικές πρωτεΐνες | | Γονίδια που κωδικοποιούν για κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες | | Γονίδια που κωδικοποιούν για πυρηνικές πρωτεΐνες | |
|---|-------------------|--|-------------------|---|-------------------|--|-------------------|
| Γονίδια (14) | TaqMan ανιχνευτές | Γονίδια (8) | TaqMan ανιχνευτές | Γονίδια (6) | TaqMan ανιχνευτές | Γονίδια (3) | TaqMan ανιχνευτές |
| ANGPTL4 | Hs01101127_m1 | UNC5B | Hs00900710_m1 | VAV3 | Hs00916814_m1 | ID1 | Hs03676575_s1 |
| ADAMTS4 | Hs00192708_m1 | EFNB2 | Hs00187950_m1 | PTGS2 | Hs00153133_m1 | EGR1 | Hs00152928_m1 |
| ADAMTS1 | Hs00199608_m1 | FLT1 | Hs01052961_m1 | ANXA3 | Hs00974395_m1 | NUPR1 | Hs01044304_g1 |
| A2M | Hs00929971_m1 | ACE | Hs00174179_m1 | PIK3CG | Hs00277090_m1 | | |
| PDGFD | Hs00228671_m1 | VIPR1 | Hs00270351_m1 | PRKAA2 | Hs00178903_m1 | | |
| TFPI2 | Hs00197918_m1 | PTGIR | Hs00168765_m1 | PTGIS | Hs00919949_m1 | | |
| COL4A1 | Hs00266237_m1 | AQP1 | Hs01028916_m1 | | | | |
| CXCL11 | Hs04187682_g1 | ITGB8 | Hs00174456_m1 | GAPDH (γονίδιο αναφοράς) | Hs02758991_g1 | | |
| TGFB2 | Hs00234244_m1 | | | | | | |
| FST | Hs00246256_m1 | | | | | | |
| DKK1 | Hs00183740_m1 | | | | | | |
| IL8 | Hs00174103_m1 | | | | | | |
| CXCL1 | Hs00236937_m1 | | | | | | |
| PTX3 | Hs00173615_m1 | | | | | | |

3.21.Επώαση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης

Υλικά: Καλλιέργειες HCAEC κυττάρων, πλήρες και βασικό θρεπτικό υλικό των HCAEC κυττάρων (Cell Applications, Inc) (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.15.1), καλλιέργειες EA.hy926 κυττάρων, πλήρες θρεπτικό υλικό των EA.hy926 κυττάρων (βλ. Υλικά της Ενότητας 3.15.2), βασικό θρεπτικό υλικό με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης 1g/L (DMEM, Gibco/ThermoFisher Scientific), FBS (Gibco/ThermoFischer Scientific), διάλυμα 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης (Gibco/ThermoFisher Scientific), ανθρῶπιнос ορός φτωχός σε λιποπρωτεΐνες (human LPDS, hLPDS) (Chemicon International/Merk Millipore), ανασυνδυασμένος VEGF του ανθρῶπου (165αα ισομορφή) (recombinant human VEGF, rhVEGF) σε λυοφιλωμένη μορφή (Chemicon International/Merk Millipore), διάλυμα rhVEGF σε συγκέντρωση 50μg/mL (stock) ή 10μg/mL σε DPBS 1X που περιέχει 0,1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich), διάλυμα χρωστικής trypan blue 0,1% (w/v) σε DPBS 1X (stock διάλυμα χρωστικής 0,5% (w/v), BIOSERA ΑΓΓΛΙΑΣ), αιματοκυτταρόμετρο Neubauer (Hirschmann), πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 6 και 12 οπών (Greiner Bio-One), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 1,5mL (Kisker Biotech). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στις Ενότητες 3.14.1 και 3.14.2.

3.21.1. Επώαση των HCAEC κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης

Κύτταρα HCAEC ίδιας γενιάς (στο 80% της κατάστασης συμβολής) σε κάθε μία από τις τρεις 75cm² φλάσκες θρυψινοποιούνται (Ενότητα 3.15.1.1), αναδιασπείρονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος (αριθμός κυττάρων ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος) για κάθε μία φλάσκα. Ειδικότερα, λαμβάνεται δείγμα από το κυτταρικό εναιώρημα το οποίο αναμειγνύεται σε αναλογία 1:1 με διάλυμα χρωστικής trypan blue 0,1% (w/v) σε DPBS 1X. Η χρωστική trypan blue χρωματίζει μπλε μόνο τα νεκρά κύτταρα, καθώς εισέρχεται στο εσωτερικό τους λόγω αυξημένης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων προσδιορίζεται με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου Neubauer και οπτικού μικροσκοπίου. Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL θρεπτικού υλικού για κάθε φλάσκα υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψιν το συντελεστή αραιώσης του κυτταρικού εναιωρήματος. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 6 οπών σε πυκνότητα 30x10⁴ κύτταρα ανά οπή σε 1,5mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Οι οπές ανά τρεις επιστρώνονται με κύτταρα από διαφορετική φλάσκα. Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 80% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~24h καλλιέργειας), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα

ξεπλένονται με 1mL HBSS (2 φορές) και προστίθεται 1mL θρεπτικού υλικού που περιέχει 0,5% (v/v) FBS, 5% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 4h (για τη μελέτη των AKT, ERK1/2, p38 MAPK, eNOS, ID1, PIK3CG και EFNB2) ή 24h (για τη μελέτη του FLT1) στους 37°C. Στη συνέχεια, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με HBSS (1 φορά) και προστίθεται 1mL θρεπτικού υλικού σύστασης 5% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει rHDL-apoE3 σε τελική συγκέντρωση 250μg/mL ή PBS 1X ή rhVEGF σε τελική συγκέντρωση 100ng/mL (δείγμα αναφοράς ή δείγμα θετικού ελέγχου, αντίστοιχα, για τη μελέτη των αλλαγών στα πρωτεϊνικά επίπεδα ή στη φωσφορυλίωση των υπό μελέτη μορίων). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 30min (για τη μελέτη της φωσφορυλίωσης των AKT, ERK1/2, p38 MAPK και eNOS) ή 12h (για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης των ID1, PIK3CG, EFNB2 και FLT1) στους 37 °C. Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία, οι οποίες προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των HCAEC κυττάρων (στην ίδια γενιά), προκειμένου να αυξηθεί η βιολογική εγκυρότητα των ευρημάτων.

3.21.2. Επώαση των EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης και φωσφορυλίωσης

Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία με αυτήν που περιγράφεται στην Ενότητα 3.15.1 με τις εξής διαφορές: 1) EA.hy926 κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 6 οπών (ή 12 οπών) σε πυκνότητα 20×10^4 (ή 10×10^4) κύτταρα ανά οπή σε 1,5mL (ή 1mL) πλήρους θρεπτικού υλικού. 2) Οι εκπλύσεις των κυττάρων γίνονται με DPBS 1X. 3) Τα κύτταρα επωάζονται σε 1mL (ή 0,5mL) θρεπτικού υλικού που περιέχει 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης για 4h (για τη μελέτη των AKT, ERK1/2, p38 MAPK και eNOS) ή 16h (για τη μελέτη των ID1, PIK3CG, EFNB2 και FLT1). 4) Τα κύτταρα επωάζονται σε 1mL (ή 0,5mL) θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει rHDL-apoE3 σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL ή PBS 1X ή rhVEGF (100ng/mL) για 30min (για τη μελέτη της φωσφορυλίωσης των AKT, ERK1/2, p38 MAPK και eNOS) ή 24h (για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης των ID1, PIK3CG, EFNB2 και FLT1).

Στο τέλος της επώασης των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων με την εκάστοτε θεραπεία (Ενότητες 3.15.1 και 3.15.2), πραγματοποιείται κυτταρική λύση και απομόνωση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ανά οπή (Ενότητα 3.22). Εφαρμόζονται αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Ενότητα 3.24.2) στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα για τη μέτρηση

των πρωτεϊνικών επιπέδων των ID1, PIK3CG, EFN2 και FLT1 και της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων και ολικών μορφών των AKT, ERK1/2, p38 MAPK και eNOS.

3.22. Λύση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων και απομόνωση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Υλικά: Διάλυμα λύσης RIPA 1X (stock διάλυμα 10X: Cell Signaling) με σύσταση: 20mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% δεοξυχολικό νάτριο, 2,5mM πυροφωσφορικό νάτριο, 1mM β-γλυκεροφωσφορικό, 1mM Na₃VO₄ και 1μg/mL λευπεπτίνη. Φαινυλμεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο (PMSF) 100mM (Sigma-Aldrich), διάλυμα αναστολέων πρωτεασών σερίνης και κυστεΐνης 1X σε ddH₂O (1% v/v) (Sigma-Aldrich), διάλυμα αναστολέων φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης 1X σε ddH₂O (1% v/v) (Roche Diagnostics GmbH), αποστειρωμένοι cell scrapers (Greiner Bio-One), αποστειρωμένα σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 1,5mL τύπου eppendorf (Kisker Biotech), ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος Heraecus Biofuge Pico, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων HBSS (Cell Applications, Inc), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων DPBS 1X χωρίς CaCl₂ MgCl₂ (Gibco/ThermoFisher Scientific), αναδευτήρας (shaker machine, Labnet International).

Προκειμένου να απομονωθούν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα για τη μελέτη της έκφρασης και φωσφορυλίωσης των υπό μελέτη πρωτεϊνών μετά από έκθεση στην εκάστοτε θεραπεία, πραγματοποιείται λύση των HCAEC ή EA.hy926 κυττάρων με μίγμα λύσης που περιέχει ιοντικό και μη ιοντικό απορρυπαντικό, καθώς και αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (βλ. Υλικά Ενότητας 3.22). Ο συνδυασμός του ισχυρού αποδιατακτικού ιοντικού απορρυπαντικού, 1% δεοξυχολικό νάτριο, και του ηπιότερου μη ιοντικού απορρυπαντικού, 1% NP-40, τα οποία περιέχονται στο διάλυμα λύσης RIPA 1X (βλ. Υλικά Ενότητας 3.22), εξασφαλίζει το σπάσιμο όλων των κυτταρικών μεμβρανών και την απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των πυρηνικών και μιτοχονδριακών. Τα άλατα που περιέχονται στο διάλυμα λύσης RIPA 1X διαμορφώνουν κατάλληλο pH και κατάλληλη ιονική ισχύ, ώστε να παραμείνουν διαλυτές οι κυτταρικές πρωτεΐνες. Στο διάλυμα λύσης RIPA 1X περιέχονται, επίσης, αναστολείς πρωτεασών σερίνης, κυστεΐνης και θρεονίνης (λευπεπτίνη) και φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης (πυροφωσφορικό νάτριο, Na₃VO₄, β-γλυκεροφωσφορικό) που παρεμποδίζουν τη δράση ενδοκυτταρικών πρωτεασών και φωσφατασών, αντίστοιχα, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη λύση, αποτρέποντας την αποικοδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών. Στο διάλυμα κυτταρικής λύσης RIPA 1X αμέσως πριν τη χρήση του προστίθενται οι εξής επιπρόσθετοι αναστολείς πρωτεασών ή

φωσφατασών: 1) φαινυλμεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο (PMSF) σε τελική συγκέντρωση 1mM (0,01% v/v) που αναστέλει πρωτεάσες σερίνης, 2) διάλυμα αναστολέων πρωτεασών σερίνης και κυστεΐνης σε τελική συγκέντρωση 0,01X (0,01% v/v) και 3) διάλυμα αναστολέων φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης σε τελική συγκέντρωση 0,01X (0,01% v/v).

Για τη λύση των κυττάρων, αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό που περιέχει την εκάστοτε θεραπεία και γίνεται έκπλυση (2 φορές) των κυττάρων με παγωμένο (4°C) HBSS (HCAEC) ή DPBS 1X (EA.hy926 κύτταρα). Προστίθεται ο κατάλληλος όγκος παγωμένου μίγματος λύσης RIPA στα κύτταρα ανά οπή (200μL, 150μL ή 100 μL για πιάτο 6, 12 ή 24 οπών, αντίστοιχα) και τα κύτταρα επωάζονται στους 4°C για 30min. Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων ανά οπή με μηχανικό τρόπο (με τη χρήση αποστειρωμένου cell scraper) στον πάγο. Το λύμα των κυττάρων ανά οπή μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf, αναδεύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα και επωάζεται στους 4°C υπό έντονη ανακίνηση σε αναδευτήρα για 30min. Σε τακτά χρονικά διαστήματα (ανά 5min), κάθε κυτταρικό λύμα υφίσταται έντονη ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυτταρικών λυμάτων στα 13.000 x g για 30min στους 4°C. Το υπερκείμενο κάθε λύματος, το οποίο περιέχει το διαλυτό κλάσμα των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων και αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα ανά δείγμα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf, και αποθηκεύεται στους -80 °C.

3.23. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του συνόλου των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων

Υλικά: Quant-iT Protein Assay Kit (Q33212, molecular probes by life technologies/Thermo Fisher Scientific) που περιέχει: 1) το αντιδραστήριο Quant-iT Protein Reagent (Q33212A), 2) το διάλυμα Quant-iT Protein Buffer (Q33212B) και 3) τα πρότυπα πρωτεϊνικά διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (0ng/μL, 200ng/μL και 400ng/μL), αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf ειδικά για Qubit assay (Thermo Fisher Scientific), ειδικό φωτόμετρο “Qubit™ 2.0 fluorometer” (Thermo Fisher Scientific)

Η συγκέντρωση του συνόλου των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων (Ενότητα 3.16) προσδιορίζεται φωτομετρικά με το σύστημα “Quant-iT Protein Assay Kit” μέσω του ειδικού φωτόμετρου “Qubit™ 2.0”, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, παρασκευάζεται κατάλληλος όγκος του διαλύματος εργασίας μέσω αραιώσης 1/200 του αντιδραστηρίου Quant-iT Protein Reagent στο διάλυμα Quant-iT Protein Buffer. Ακολουθεί η προετοιμασία των πρότυπων πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης (0ng/μL, 200ng/μL και 400ng/μL): Σε αποστειρωμένο σωληνάριο

τύπου erpendorf ειδικό για Qubit assay προστίθενται 10μL από κάθε πρότυπο διάλυμα και 190μL διαλύματος εργασίας (αραίωση 1/20). Για την προετοιμασία των δειγμάτων, 1μL από κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστίθεται σε 199μL διαλύματος εργασίας (αραίωση 1/200). Μετά απο ανάδευση των πρότυπων διαλυμάτων και των δειγμάτων σε κυκλοαναδευτήρα ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, υπό σκοτάδι, για 15min. Η μέτρηση της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων ή των δειγμάτων γίνεται στα 485/590nm στο φωτόμετρο “Qubit™”. Αρχικά, μετράται η απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων και η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με 0, 2 και 4μg πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του συνόλου των πρωτεϊνών για κάθε δείγμα (μg/mL) υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη. Η τελική συγκέντρωση ανά δείγμα υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψιν το συντελεστή αραίωσης.

3.24. Ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση western

3.24.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Υλικά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (4-20% Mini-Protean TGX Precast Protein gel, Bio-Rad), τα υπόλοιπα υλικά ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.13.1, λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν σφάλματα του συστήματος “Quant-iT Protein Assay Kit” (Ενότητα 3.23) στον υπολογισμό της συγκέντρωσης του συνόλου των πρωτεϊνών στα υπό μελέτη δείγματα και με αυτόν τον τρόπο να επιτευχθεί καλύτερη ισοφόρτωση των δειγμάτων κατά την ανάλυσή τους με ανοσοαποτύπωση western (Ενότητα 3.24.2), πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 10% (v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Πίνακας 3.6). Ακολουθεί ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών ανά δείγμα.

Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε αποδιατακτικές συνθήκες ακολουθείται η εξής πειραματική πορεία: Αρχικά, προετοιμάζονται τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση ως εξής: 25-35μg πρωτεΐνης ανά δείγμα αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης δείγματος 5X σε αναλογία 4:1, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος φόρτωσης στο μίγμα ηλεκτροφόρησης να είναι 1X. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος στους 95°C για 5min και φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή. Παράλληλα φορτώνονται πρωτεϊνικοί δείκτες με γνωστά μοριακά βάρη στην ίδια πηκτή για την εκτίμηση του

μοριακού βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Ακολουθεί διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό μέγεθος με ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση 120V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X για ~1,5h. Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών στην αντίστοιχη περιοχή του μοριακού βάρους γίνεται με την εμβάπτιση της πηκτής μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 για ~1h και επακόλουθο αποχρωματισμό σε διάλυμα αποχρωματισμού για ~30-45min, υπό ήπια ανακίνηση. Ακολουθεί η πυκνομετρική ποσοτικοποίηση τεσσάρων πρωτεϊνικών ζωνών ανά δείγμα με το λογισμικό ImageJ, υπολογισμός του μέσου όρου και εύρεση της συγκέντρωσης του εκάστοτε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Με βάση τη διορθωμένη αυτή συγκέντρωση του κάθε δείγματος, υπολογίζεται ο κατάλληλος όγκος του εκάστοτε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί σε 40-80μg συνολικής πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προετοιμάζονται, όπως περιγράφεται παραπάνω, και ηλεκτροφορούνται υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου περιεκτικότητας 8% (v/v), 10% (v/v), 12% (v/v) (Πίνακας 3.6) ή διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v), ανάλογα με το μοριακό βάρος της εκάστοτε υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε σταθερή τάση 120V και διαρκεί ~1,5h. Ακολουθεί ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ανοσοαποτύπωση western (Ενότητα 3.24.2).

Πίνακας 3.6: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίο 8% (v/v) ή 10% (v/v) ή 12% (v/v) και επιστοίβασης για ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες.

| Πηκτή διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο (v/v) | Πηκτή επιστοίβασης περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 5% (v/v) (4mL) | | | | |
|--|--|------------|------------|------------------------------|-------|
| | 8% (10mL) | 10% (10mL) | 12% (10mL) | | |
| ddH ₂ O | 4,6mL | 4,0mL | 3,3mL | ddH ₂ O | 2,7mL |
| Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% | 2,7mL | 3,3mL | 4,0mL | Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% | 670μL |
| Διάλυμα Tris-HCl 1,5M pH 8,8 | 2,5mL | 2,5mL | 2,5mL | Διάλυμα Tris-HCl 1,0M pH 6,8 | 500μL |
| Διαλύμα SDS 10% | 100μL | 100μL | 100μL | Διαλύμα SDS 10% | 40μL |
| Διάλυμα APS 10% | 100μL | 100μL | 100μL | Διάλυμα APS 10% | 40μL |
| TEMED | 6μL | 4μL | 4μL | TEMED | 4μL |

3.24.2. Ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ανοσοαποτύπωση western

Υλικά: Trizma Base (Sigma-Aldrich), γλυκίνη (Sigma-Aldrich), μεθανόλη (Appllichem), διάλυμα μεταφοράς 1X: 6,04gr Trizma Base, 28,8g γλυκίνη, 400mL μεθανόλη και dH₂O μέχρι 2L (αποθηκεύεται στους 4°C), μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Bio-Rad), διηθητικό χαρτί Whatman (Whatmann), διάλυμα χρωστικής Ponceau S (Appllichem), Tween-20 (Sigma-Aldrich), NaCl (Appllichem), διάλυμα πλύσης TBST 10X: 6,05gr Trizma Base, 43,8gr NaCl, 2,5mL Tween-20 και dH₂O μέχρι 500mL, διάλυμα πλύσης TBST 1X: 100mL TBST 10X και 900mL dH₂O, άπαχο γάλα σε σκόνη (Regilait ή Appllichem), BSA (Sigma-Aldrich), διάλυμα blocking (5% (w/v) άπαχο γάλα ή BSA σε σκόνη σε διάλυμα πλύσης TBST 1X, κασέτα μεταφοράς (Bio-Rad), συσκευή μεταφοράς (Bio-Rad), σφουγγάρια μεταφοράς (Bio-Rad), παγοκύστη, τροφοδοτικό Consort Bioblock E341, αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) (Pierce/Thermo Fisher Scientific), πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα (Πίνακας 3.7), κασετίνα εμφάνισης φιλμ (Amersham), φιλμ αυτοραδιογραφίας (RX FUJI), διάλυμα εμφάνισης φιλμ (Developer, FUJI Hunt Photographic Chemicals), διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ (Fixer, FUJI Hunt Photographic Chemicals), μηχανήμα ανίχνευσης και εμφάνισης χημειοφωταύγειας, αναδευτήρας (shaker machine, Labnet International ή GFL), λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Για την ανοσοαποτύπωση western, οι πρωτεΐνες έπειτα από το διαχωρισμό τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Ενότητα 3.22.1), μεταφέρονται με ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (συνήθως τύπου whatman ή PVDF) μέσω δυνάμεων συνάφειας όπου και ακινητοποιούνται. Ειδικότερα, η πηκτή διαχωρισμού μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης επωάζεται σε διάλυμα μεταφοράς 1X, ώστε να απομακρυνθεί το SDS καθώς η παραμονή του στις πρωτεϊνικές ζώνες της πηκτής μετριάζει την ικανότητα πρόσδεσής τους στην νιτροκυτταρίνη. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τα διηθητικά φύλλα χαρτιού whatman και τα σφουγγάρια ηλεκτρομεταφοράς, επίσης, εξισσοροπούνται στο διάλυμα μεταφοράς 1X. Έπειτα, η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται μαζί με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τα φύλλα χαρτιού whatman και τα σφουγγάρια στην κασέτα μεταφοράς με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται ένα sandwich ηλεκτρομεταφοράς. Το sandwich τοποθετείται με το σωστό προσανατολισμό στη συσκευή μεταφοράς που περιέχει διάλυμα μεταφοράς 1X. Η επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί την κίνηση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνικών ζωνών της πηκτής προς την κάθοδο (θέση στην οποία έχει τοποθετηθεί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην κασέτα μεταφοράς). Η ηλεκτρο-μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από την πηκτή

πολυκρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνεται σε σταθερή τάση 350mA (~120-130V) στους 4°C. Η διάρκεια της ηλεκτρο-μεταφοράς εξαρτάται από το μοριακό βάρος της εκάστοτε υπό μελέτη πρωτεΐνης. Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους η ηλεκτρο-μεταφορά διαρκεί 1,5h, ενώ οι πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος μεταφέρονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε 1h. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται σε διάλυμα πλύσης TBST 1X για 1min, υπό ανακίνηση, για την απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος μεταφοράς. Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών μεσω επώασης της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το διάλυμα χρωστικής Ponceau S. για 3-5min, υπό ανακίνηση, προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη και η ισοφόρτωση των δειγμάτων. Η μεμβράνη εκπλένεται με το διάλυμα TBST 1X τρεις φορές (για 5min κάθε φορά) προς απομάκρυνση της χρωστικής. Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα blocking (5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBST 1X για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης ή 5% (w/v) BSA σε TBST 1X για τη μελέτη φωσφορυλίωσης) για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανακίνηση, ώστε να επικαλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα που έχει αραιωθεί σε διάλυμα blocking, το οποίο είναι ειδικό για την εκάστοτε υπό μελέτη πρωτεΐνη (Πίνακας 3.7), για ~16-18h στους 4°C υπό ήπια ανακίνηση. Την επόμενη μέρα γίνονται τέσσερις εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBST 1X διάρκειας 5min η κάθε μία, προκειμένου να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη το πρωτογενές αντίσωμα που δεν έχει δεσμευθεί. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο έχει αραιωθεί σε διάλυμα blocking, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανακίνηση. Ανάλογα με την προέλευση του εκάστοτε πρωτογενούς αντισώματος – από κουνέλι ή ποντικό – χρησιμοποιείται κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για IgG από κουνέλι ή ποντικό, αντίστοιχα (Πίνακας 3.7). Το δευτερογενές αντίσωμα προσδένεται στο πρωτογενές, ανιχνεύοντας με αυτόν τον τρόπο το σύμπλεγμα πρωτογενούς αντισώματος- πρωτεΐνης στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η ποσότητα του δευτερογενούς αντισώματος που δεσμεύεται στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι ανάλογη με την ποσότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης στο εκάστοτε δείγμα. Κατόπιν, η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα TBST 1X τέσσερις φορές διάρκειας 5min η κάθε μία, προκειμένου να απομακρυνθεί το δευτερογενές αντίσωμα που δεν έχει δεσμευθεί. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το μίγμα διαλυμάτων του kit χημειοφωταύγειας (ECL), το οποίο περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου που φέρει το δευτερογενές αντίσωμα, για 2min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, η μεμβράνη μεταφέρεται σε κασέτα εμφάνισης και

καλύπτεται με φιλμ αυτοραδιογραφίας το οποίο τοποθετείται στο μηχάνημα εμφάνισης χημειοφωταύγειας.

Το σύμπλεγμα πρωτογενούς αντισώματος-πρωτεΐνης στην επιφάνεια της μεμβράνης ανιχνεύεται με τη μέθοδο έκλυσης χημειοφωταύγειας λόγω αντίδρασης του ενζύμου που φέρει το δευτερογενές αντίσωμα με το κατάλληλο υπόστρωμα. Ειδικότερα, το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (HRP) που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα οξειδώνεται παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το υπόστρωμα λουμινόλη προκαλεί την εκπομπή φωτονίων που ανιχνεύονται από το μηχάνημα εμφάνισης χημειοφωταύγειας και εμφανίζονται υπό τη μορφή ζώνης στο φιλμ. Η θέση εμφάνισης της ζώνης στο φιλμ αντιστοιχεί στη θέση του σχηματιζόμενου συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος για κάθε δείγμα. Η οπτική πυκνότητα της κάθε ζώνης καθορίζεται από την ποσότητα του αντιγόνου. Έτσι, μεταβολές της πυκνότητας των ζωνών που αφορούν στο ίδιο αντιγόνο ανάμεσα σε δύο ισόποσα δείγματα ολικής πρωτεΐνης, τα οποία αναλύονται παράλληλα με ανοσοαποτύπωση western, αντιστοιχούν σε σχετική μεταβολή της ποσότητας του αντιγόνου και αναδεικνύουν διαφορά στην έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Οι ζώνες (ανοσοαποτυπώματα) ποσοτικοποιούνται πυκνομετρικά με το λογισμικό ImageJ.

Πίνακας 3.7: Σύνοψη των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται στην ανοσοαποτύπωση western και των χαρακτηριστικών τους (προέλευση, αραίωση κλπ).

| Αντίσωμα (Ab) | Προέλευση | Αραίωση | Μοριακό βάρος πρωτεΐνης-στόχου | Κωδικός και Κατασκευαστικός Οίκος |
|--|-----------|-------------------------------|--------------------------------|---|
| Πολυκλωνικό Ab έναντι του Id1 (κλώνος C-20) | Κουνέλι | 1:800 σε 5% γάλα σε TBST 1X | 15 kDa | sc-488 Santa Cruz Biotechnology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της p110γ υπομονάδας της PI3K κινάσης (κλώνος D55D5) | Κουνέλι | 1:1.000 σε 5% γάλα σε TBST 1X | 110 kDa | 5405 Cell Signaling Technology |
| Πολυκλωνικό Ab έναντι της ephrin-B2 (κλώνος P-20) | Κουνέλι | 1:150 σε 5% γάλα σε TBST 1X | 37 kDa | sc-1010 Santa Cruz Biotechnology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της ephrin-B2 (κλώνος F-2) | Ποντίκι | 1:500 σε 5% γάλα σε TBST 1X | 37 kDa | sc-39873 Santa Cruz Biotechnology |
| Πολυκλωνικό Ab έναντι του Flt-1 | Κουνέλι | 1:500 σε | 180 kDa | sc-316 |

| | | | | |
|---|---------|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| (κλώνος C-17) | | 5% γάλα σε TBST 1X | | Santa Cruz Biotechnology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της Akt κινάσης φωσφορυλιωμένης στη θέση Ser473 (κλώνος D9E) | Κουνέλι | 1:2.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 60 kDa | 4060 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της Akt (κλώνος C67E7) | Κουνέλι | 1:4.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 60 kDa | 4691 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της p44/42 MAPK (pERK1/2 κινάση) φωσφορυλιωμένης στη θέση Thr202/Tyr204 (p-Erk1/2 κινάση) (κλώνος 20G11) | Κουνέλι | 1:4.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 42 kDa (p-Erk1) 44 kDa (p-Erk2) | 4376 Cell Signaling Technology |
| Πολυκλωνικό Ab έναντι της p44/42 MAPK φωσφορυλιωμένης στη θέση Thr202/Tyr204 (p-Erk1/2 κινάση) | Κουνέλι | 1:2.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 42 kDa (p-Erk1) 44 kDa (p-Erk2) | 9101 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της p44/42 MAPK (Erk1/2 κινάση) (κλώνος 137F5) | Κουνέλι | 1:5.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 42 kDa (Erk1) 44 kDa (Erk2) | 4695 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της p38 MAPK φωσφορυλιωμένης στη θέση Thr180/Tyr182 (κλώνος D3F9) | Κουνέλι | 1:2.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 43 kDa | 4511 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της p38 MAPK (κλώνος D13E1) | Κουνέλι | 1:4.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 40 kDa | 8690 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της eNOS φωσφορυλιωμένης στη θέση Ser1177 (κλώνος C9C3) | Κουνέλι | 1:2.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 140 kDa | 9570 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της eNOS (κλώνος 49G3) | Κουνέλι | 1:1.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 140 kDa | 9586 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της eNOS (κλώνος 6H2) | Ποντίκι | 1:1.000 σε 5% BSA σε TBST 1X | 140 kDa | 5880 Cell Signaling Technology |
| Μονοκλωνικό Ab έναντι της β ακτίνης (κλώνος C4) | Ποντίκι | 1:5.000 σε 5% γάλα σε TBST 1X | 43 kDa | MAB1501 Chemicon International/Merk |

| | | | | |
|--|------|-------------------------------------|--|------------------------|
| | | | | Millipore |
| Δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP έναντι IgG από κουνέλι | Αίγα | 1:10.000 σε 5% γάλα σε TBST 1X | | 170-6515 Bio-Rad |
| Δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP έναντι IgG ποντικού | Αίγα | 0,6:10.000 σε 5% γάλα σε TBST 1X | | A9917 Sigma-Aldrich |

3.25. Επώαση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη κυτταρικής μετανάστευσης με τη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»

Υλικά: Αναστροφο μικροσκοπιο Leica DFC-500 με ενσωματωμένη κάμερα ORCA-FLASH4.LT. (Black and white), λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στις Ενότητες 3.14.1, 3.14.2 και 3.15.

Η ικανότητα της rHDL-apoE3 να επάγει μετανάστευση στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα μελετήθηκε με τη δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» (wound healing assay) (Ενότητες 3.19.1.2 και 3.19.2.2). Η τεχνική αυτή αποτελεί μία αξιόπιστη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της κυτταρικής μετανάστευσης που εφαρμόζεται ευρέως σε ποικιλία κυτταρικών τύπων μετά από έκθεση στην εκάστοτε θεραπεία [476]. Συνοπτικά, η συγκεκριμένη δοκιμασία μετανάστευσης περιγράφεται ως εξής: Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 90-100% της κατάστασης συμβολής πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων σε συνθήκες στέρησης ορού για 16h προκειμένου αυτά να συγχρονιστούν στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου και να ανασταλλεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός [477]. Κατόπιν, δημιουργείται μια τεχνητή «πληγή» (χαραγή) στην επιφάνεια του μονόστιβου της κυτταροκαλλιέργειας και ακολουθεί επώαση των κυττάρων με την εκάστοτε θεραπεία για 24h. Η επίδραση της θεραπείας στην κυτταρική μετανάστευση αξιολογείται μέσω της ικανότητας επούλωσης της «πληγής» των κυττάρων και η κυτταρική μετανάστευση στην περιοχή της «πληγής» προσδιορίζεται ποσοτικά.

3.25.1. Μελέτη μετανάστευσης στα HCAEC κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 με τη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»

3.25.1.1. Πιλοτικά πειράματα εδραίωσης της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα

Η επίδραση της rHDL-apoE3 στη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μελετήθηκε με τη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Προηγήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα όπου εξετάστηκαν βασικές παράμετροι (όπως ο αριθμός των κυττάρων επίστρωσης ανά οπή κυτταροκαλλιέργειας, ο απαιτούμενος βαθμός συμβολής των κυττάρων πριν τη στέρηση ορού, το μέγεθος της χαραγής, κ.α.) και ένα εύρος συνθηκών στέρησης ορού (Πίνακας 3.8), ώστε να προσδιοριστούν οι εξεταζόμενοι παράγοντες και να εδραιωθεί η δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα.

Εξετάστηκε η επίστρωση διαφορετικού αριθμού κυττάρων ανά οπή πιάτου κυτταροκαλλιέργειας 12 οπών: α) 15×10^4 κύτταρα, β) 18×10^4 κύτταρα και γ) 25×10^4 . Η κατάσταση συμβολής των κυττάρων μετά από ~24h καλλιέργειας σε πλήρες θρεπτικό υλικό ήταν συγκριτικά μεγαλύτερη όταν τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πυκνότητα 25×10^4 κύτταρα ανά οπή, η οποία έφτανε το 90-100%. Οπότε, και επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων επίστρωσης.

Όταν τα κύτταρα ανά οπή είχαν πολλαπλασιαστεί στο 90-100% της κατάστασης συμβολής, εξετάστηκε ένα εύρος συνθηκών στέρησης ορού για 16h και επακολούθως για 24h επώασης (Πίνακας 3.8). Μετά από 16h, απομακρύνθηκε μία καθορισμένη περιοχή κυττάρων από τον πυθμένα της οπής, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με HBSS και ακολούθησε η χορήγηση των εξεταζόμενων θρεπτικών υλικών στέρησης ορού (A-I). Αμέσως μετά τη χορήγηση, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε 5 οπτικά πεδία/οπή (10X) στην περιοχή της «πληγής» (0h), σε ανάστροφο μικροσκόπιο και κατόπιν επωάστηκαν στους 37°C για 24h. Μετά από 24h, τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν στα 5 οπτικά πεδία/οπή (10X) που καθορίστηκαν τη χρονική στιγμή 0h.

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες στέρησης ορού αξιολογήθηκε η επίδραση των εξεταζόμενων συνθηκών (Πίνακας 3.8) στη βιωσιμότητα, την κατάσταση συμβολής, την αναστολή του πολλαπλασιασμού και τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων. Η βιωσιμότητα και η κατάσταση συμβολής των κυττάρων μειωνόταν, σε μεγάλο βαθμό, σε αρκετές από τις εξεταζόμενες συνθήκες στέρησης ορού (π.χ. Πίνακας 3.8: E και I). Ωστόσο, για ορισμένες από τις εξεταζόμενες συνθήκες δεν παρατηρήθηκε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ η κυτταρική μετανάστευση ήταν συγκριτικά αυξημένη

(π.χ. Πίνακας 3.8: Α). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, επιλέχθηκαν οι εξής βέλτιστες συνθήκες στέρησης ορού στις οποίες ιδανικά δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα και η κατάσταση συμβολής των κυττάρων, ενώ παρατηρείται αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού: επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 0,5% (v/v) FBS και 1% (v/v) hLPDS για 16h και επακόλουθη επώαση για 24h σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,25% (v/v) FBS και 1% (v/v) hLPDS (Πίνακας 3.8: Ζ). Υπό αυτές τις συνθήκες, χορηγήθηκε η rhDL-αροΕ3 στα HCAEC κύτταρα και αξιολογήθηκε η επίδρασή της στην κυτταρική μετανάστευση (Ενότητα 3.25.1.2).

Πίνακας 3.8: Διαφορετικές συνθήκες στέρησης ορού που εξετάστηκαν στα πιλοτικά πειράματα κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα.

| | Σύσταση θρεπτικού υλικού στέρησης ορού σε FBS και hLPDS (v/v) | |
|----|---|------------------------|
| | 16h | 24h |
| A | 1,5% FBS και 5% hLPDS | 1% FBS και 5% hLPDS |
| B | 1% FBS και 5% hLPDS | 0,5% FSB και 5% hLPDS |
| Γ | 0,5% FBS και 5% hLPDS | 0,25% FBS και 5% hLPDS |
| Δ | 0,5% FBS και 5% hLPDS | 0,1% FBS και 5% hLPDS |
| E | 0,5% FBS και 5% hLPDS | 0% FBS και 5% hLPDS |
| ΣΤ | 1% FBS και 1% hLPDS | 0,5% FBS και 1% hLPDS |
| Z | 0,5% FBS και 1% hLPDS | 0,25% FBS και 1% hLPDS |
| H | 1% FBS και 0% hLPDS | 0,5% FBS και 0% hLPDS |
| Θ | 0,5% FBS και 0% hLPDS | 0,25% FBS και 0% hLPDS |
| I | 0,5% FBS και 0% hLPDS | 0,1% FBS και 0% hLPDS |

Προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση του rhVEGF που επάγει μετανάστευση στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα θετικού ελέγχου της κυτταρικής μετανάστευσης στα κύτταρα αυτά [478, 479], πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα της δοκιμασίας προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Εξετάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις του rhVEGF - 50, 80 και 100ng/mL -, οι οποίες προτείνονται από τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία, σε συνθήκες στέρησης ορού για 24h επώασης των HCAEC ή EA.hy926 κυττάρων. Κύτταρα HCAEC ή EA.hy926 που επωάστηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού απουσία rhVEGF για 24h χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα αναφοράς. Από την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής μετανάστευσης με το λογισμικό

ImageJ (Cell Counter ανάλυση) προέκυψε ότι ο rhVEGF επάγει μετανάστευση στα HCAEC ή EA.hy926 κύτταρα και στις τρεις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς. Ωστόσο, η συγκέντρωση στην οποία ο rhVEGF αύξησε σε μεγαλύτερο βαθμό τη μετανάστευση και στους δύο τύπους κυττάρων ήταν τα 100ng/mL. Επομένως, ο rhVEGF σε αυτήν τη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα θετικού ελέγχου στις δοκιμασίες «επούλωσης πληγής» που εφαρμόστηκαν στα HCAEC ή EA.hy926 για τη μελέτη της επίδρασης της rHDL-αροΕ3 στην κυτταρική μετανάστευση (Ενότητα 3.25.1.2 και 3.25.2.2).

3.25.1.2. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-αροΕ3

Κύτταρα HCAEC ίδιας γενιάς (στο 80% της κατάστασης συμβολής) από κάθε μία από τις τρεις 75cm² φλάσκες επιστρώνονται (Ενότητα 3.21.1) σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 12 οπών σε πυκνότητα 25x10⁴ κύτταρα ανά οπή σε 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Οι οπές ανά τρεις επιστρώνονται με κύτταρα από διαφορετική φλάσκα. Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 90-100% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~24h καλλιέργειας), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, γίνεται έκπλυση των κυττάρων με 0,5mL HBSS (2 φορές) και επάζονται για 16h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5 % FBS (v/v), 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά. Μετά από 16h, δημιουργείται μία χαραγή («πληγή») στην επιφάνεια του μονόστιβου της κυτταροκαλλιέργειας ανά οπή μέσω χρήσης ενός αποστειρωμένου ρύγχους (όγκου 200μL) και τα κύτταρα αποκολλώνται στην περιοχή της «πληγής». Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με HBSS (2 φορές), ώστε να απομακρυνθούν τα αποκολλημένα κύτταρα σε κάθε οπή. Κατόπιν, προστίθεται 0,65mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,25% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει rHDL-αροΕ3 (100μg/mL) ή PBS 1X ή rhVEGF (100ng/mL) (δείγμα αναφοράς ή δείγμα θετικού ελέγχου κυτταρικής μετανάστευσης, αντίστοιχα). Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία που προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των HCAEC κυττάρων (στην ίδια γενιά). Αμέσως μετά τη χορήγηση της εκάστοτε θεραπείας ανά οπή, ακολουθεί φωτογράφιση των κυττάρων σε 10 οπτικά πεδία/οπή (10X) στην περιοχή της «πληγής» (0h) σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επάζονται για 24h στους 37°C. Μετά από 24h, τα κύτταρα μονιμοποιούνται και γίνεται χρώση των πυρήνων τους με αιματοξυλίνη (Ενότητα 3.20). Ακολουθεί φωτογράφιση των κυττάρων στα 10 οπτικά πεδία/οπή (10X) (24h) που φωτογραφήθηκαν τη χρονική στιγμή 0h, σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει στην περιοχή της «πληγής» μετά από 24h επώασης με

την εκάστοτε θεραπεία ποσοτικοποιείται με το λογισμικό ImageJ (Cell Counter ανάλυση) και υπολογίζεται ως εξής: “αριθμός κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει στην περιοχή της «πληγής» στις 24h” – “αριθμός κυττάρων στην περιοχή της «πληγής» στις 0h”. Η κυτταρική μετανάστευση για την εκάστοτε θεραπεία υπολογίζεται ως % ποσοστό ως προς το δείγμα αναφοράς.

3.25.2. Μελέτη μετανάστευσης στα EA.hy926 κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-αποE3 με τη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»

3.25.2.1. Πιλοτικά πειράματα εδραίωσης και βελτιστοποίησης της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα EA.hy926 κύτταρα

Η ικανότητα της rHDL-αποE3 να επάγει μετανάστευση αξιολογήθηκε, επίσης, και στα EA.hy926 κύτταρα μέσω της δοκιμασίας «επούλωσης πληγής». Προηγήθηκαν πιλοτικά πειράματα όπου εξετάστηκαν βασικές παράμετροι, προκειμένου να εδραιωθεί η δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα κύτταρα αυτά. Ειδικότερα, εξετάστηκε η επίστρωση διαφορετικού αριθμού κυττάρων ανά οπή πιάτου κυτταροκαλλιέργειας 12 οπών: α) 10×10^4 κύτταρα, β) 15×10^4 κύτταρα και γ) 18×10^4 κύτταρα. Μετά από ~24h καλλιέργειας σε πλήρες θρεπτικό υλικό παρατηρήθηκε συκριτικά μεγαλύτερη κατάσταση συμβολής όταν τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πυκνότητα 18×10^4 κύτταρα ανά οπή, η οποία έφτανε το 90-100%. Οπότε, επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων επίστρωσης. Όταν τα κύτταρα ανά οπή είχαν πολλαπλασιαστεί στο 90-100% της κατάστασης συμβολής, εξετάστηκαν οι παρακάτω συνθήκες στέρησης ορού: α) επώαση σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS για 16h και επακόλουθη επώαση σε θρεπτικό υλικό ίδιας σύστασης για 24h, β) επώαση σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,1% (v/v) FBS για 16h και επακόλουθη επώαση σε θρεπτικό υλικό απουσία FBS για 24h, γ) επώαση σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει FBS για 16h και επακόλουθη επώαση σε θρεπτικό υλικό ίδιας σύστασης για 24h. Εφαρμόστηκαν δοκιμασίες «επούλωσης πληγής» στα κύτταρα στις εξεταζόμενες συνθήκες στέρησης ορού. Τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν στα χρονικά σημεία 0h και 24h σε ανάστροφο μικροσκόπιο (βλ. Ενότητα 3.25.1.1).

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες στέρησης ορού, αξιολογήθηκε η επίδραση των εξεταζόμενων συνθηκών (α-γ) στη βιωσιμότητα, την κατάσταση συμβολής, την αναστολή του πολλαπλασιασμού και τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκε μείωση στη βιωσιμότητα και την κατάσταση συμβολής των κυττάρων σε καμία από τις εξεταζόμενες συνθήκες στέρησης ορού. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές,

επιλέχθησαν οι εξής συνθήκες στέρησης ορού σε συμφωνία με τις αντίστοιχες συνθήκες που εφαρμόστηκαν στις δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης τύπου «Transwell» (Ενότητα 3.27) στα EA.hy926 κύτταρα: επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS για 16h, και επακόλουθη επώαση για 24h σε θρεπτικό υλικό ίδιας σύστασης (α). Υπό αυτές τις συνθήκες, χορηγήθηκε η rHDL-apoE3 στα EA.hy926 κύτταρα και αξιολογήθηκε η επίδρασή της στην κυτταρική μετανάστευση (Ενότητα 3.25.2.2).

Προηγήθηκαν δοκιμασίες προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα EA.hy926 κύτταρα που εκτέθηκαν σε HDL, η οποία απομονώθηκε από ορό αίματος ανθρώπου (hHDL) (Ενότητα 3.14), σε συνθήκες στέρησης ορού για 24h, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η εν λόγω δοκιμασία στα κύτταρα αυτά. Εξετάστηκαν δύο συγκεντρώσεις της hHDL, 250μg/mL και 500μg/ml, οι οποίες υπολογίστηκαν με βάση τη συνολική ποσότητα των πρωτεϊνών-συστατικών της και αντιστοιχούν σε 12.5 και 25μg/mL, αντίστοιχα, με βάση την περιεχόμενη ποσότητα της apoA-I. Κύτταρα EA.hy926 που επώαστηκαν για 24h σε συνθήκες στέρησης ορού παρουσία PBS ή σε θρεπτικό υλικό σύστασης 5% (v/v) FBS χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα αναφοράς ή δείγμα θετικού ελέγχου της κυτταρικής μετανάστευσης, αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα και σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία που προήλθαν από δύο διαφορετικές καλλιέργειες των EA.hy926 κυττάρων (στην ίδια γενιά).

3.25.2.2. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα EA.hy926 κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3

Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία με αυτήν που περιγράφεται στην Ενότητα 3.25.1.2 με τις εξής διαφορές: 1) EA.hy926 κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 12 οπών σε πυκνότητα 18×10^4 κύτταρα ανά οπή σε πλήρες θρεπτικό υλικό. 2) Οι εκπλύσεις των κυττάρων γίνονται με DPBS 1X. 3) Τα κύτταρα επώάζονται για 16h σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0.5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά. 4) Τα κύτταρα επώάζονται για 24h σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει rHDL-apoE3 (50 ή 100μg/mL) ή PBS 1X ή rhVEGF (100ng/mL).

3.26. Μονιμοποίηση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων και χρώση των πυρήνων με αιματοξυλίνη

Υλικά: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων HBSS (Cell Applications, Inc), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων DPBS 1X χωρίς CaCl_2 MgCl_2 (Gibco/Thermo Fisher Scientific), Μεθανόλη (Applichem), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), stock διάλυμα Triton X-100 10% (v/v) σε DPBS 1X, διάλυμα Triton X-100 0,2% (v/v) σε DPBS 1X, διάλυμα χρωστικής αιματοξυλίνης

Mayer's (φιλτράρεται με φίλτρο 0,2μM) (Sigma-Aldrich).

Μετά το πέρας της επώασης των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων με την εκάστοτε θεραπεία για 24h στις δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» (Ενότητες 3.19.1.2, 3.19.2.2, 3.22.3 και 3.24.4) απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ανά οπή του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας των 12 οπών (ή 24 οπών) ξεπλένονται (1 φορά) με 0,5mL (ή 0,25mL) κρύο (4°C) HBSS (HCAEC) ή DPBS 1X (EA.hy926). Προστίθεται 0,5mL (ή 0,25mL) παγωμένης μεθανόλης (-20°C) ανά οπή και τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15min, ώστε να μονιμοποιηθούν. Κατόπιν, η μεθανόλη απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,6mL (ή 0,3mL) κρύου HBSS (HCAEC) ή DPBS 1X (EA.hy926) (2 φορές). Ακολουθεί προσθήκη 0,5mL (ή 0,25mL) κρύου Triton X-100 0,2% (v/v) σε DPBS 1X ανά οπή και τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15min, ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος Triton X-100, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,6mL (ή 0,3mL) κρύου HBSS (HCAEC) ή DPBS 1X (EA.hy926) (1 φορά). Προστίθεται 0,5mL (ή 0,25mL) διαλύματος αιματοξυλίνης ανά οπή και τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min, υπό σκοτάδι, ώστε να γίνει χρώση των πυρήνων τους με μπλε-μωβ χρώμα. Μετά την απομάκρυνση της αιματοξυλίνης, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,5mL (ή 0,25mL) κρύου dH₂O (2 φορές), ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια χρωστικής. Προστίθεται 0,5mL (ή 0,25mL) κρύου dH₂O ανά οπή και ακολουθεί φωτογράφιση των μονιμοποιημένων κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

3.27. Μελέτη μετανάστευσης στα EA.hy926 κύτταρα μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 με τη δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης τύπου «Transwell»

Υλικά: Πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 24 οπών με 12 ένθετα «transwell» που περιέχουν μεμβράνη πολυεστέρα με πόρους 8μm (Corning Incorporated Life Sciences), διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% (w/v) σε DPBS 1X (Sigma-Aldrich), μεθανόλη (Applichem), κρυσταλλικό ιώδες (Sigma-Aldrich), υδατικό διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους 0,5% (w/v), 50mL: 0,25gr κρυσταλλικό ιώδες, 12,5mL μεθανόλη και 37,5mL dH₂O, αναστροφο μικροσκόπιο Leica DFC-500 με ενσωματωμένη έγχρωμη κάμερα Leica, λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στις Ενότητες 3.14.2 και 3.15.

Η ικανότητα της rHDL-apoE3 να επάγει μετανάστευση στα EA.hy926 κύτταρα αξιολογήθηκε, επίσης, μέσω της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης διαμέσου πορώδους μεμβράνης

(τύπου «Transwell»). Κύτταρα EA.hy926 ίδιας γενιάς (στο 80% της κατάστασης συμβολής) σε κάθε μία από τις τρεις 25cm² φλάσκες επωάζονται σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά για 16h στους 37°C. Μετά από 16h, τα κύτταρα επιστρώνονται σε πυκνότητα 10x10⁴ κύτταρα σε 300μL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά σε κάθε ένα ένθετο «transwell» με ενσωματωμένη πορώδη (8μm) μεμβράνη στο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 24 οπών. Τα ένθετα ανά τρία επιστρώνονται με κύτταρα από διαφορετική φλάσκα. Τα κύτταρα επωάζονται για 30min στους 37°C και κατόπιν προστίθεται rHDL-apoE3 (100μg/mL) ή rhVEGF (100ng/mL) (δείγμα θετικού ελέγχου) σε κάθε ένθετο. Κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε rHDL-apoE3 ή rhVEGF αποτέλεσαν το δείγμα ελέγχου της ενδογενούς κυτταρικής μετανάστευσης (κύτταρα αναφοράς). Στις οπές όπου είναι τοποθετημένα τα επιστρωμένα με κύτταρα ένθετα προστίθενται 700μL θρεπτικού υλικού σύστασης 10% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με την εκάστοτε θεραπεία για 20h στους 37°C. Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία που προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των EA.hy926 κυττάρων (στην ίδια γενιά). Μετά από 20h, τα κύτταρα που παρέμειναν στην άνω πλευρά της μεμβράνης σε κάθε ένθετο αφαιρούνται με μηχανικό τρόπο (με τη χρήση μπατονέτας) και το θρεπτικό υλικό ανά ένθετο απομακρύνεται. Τα κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει μέσω των πόρων στην κάτω επιφάνεια της μεμβράνης σε κάθε ένθετο ξεπλένονται με DPBS 1X (2 φορές) και μονιμοποιούνται με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% (w/v) σε DPBS 1X (1mL ανά οπή) για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απομάκρυνσή του, τα κύτταρα ξεπλένονται με DPBS 1X (2 φορές) και επωάζονται με υδατικό διάλυμα της χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους 0,5% (w/v) (1mL ανά οπή) για 10min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό σκοτάδι, ώστε να γίνει χρώση των πυρήνων τους με βαθύ κυανό-ιώδες χρώμα. Η χρωστική απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με αποστειρωμένο dH₂O (2 φορές), ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της. Τα κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει στην κάτω επιφάνεια της μεμβράνης σε κάθε ένθετο φωτογραφίζονται σε 25 τυχαία οπτικά πεδία (20X) σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Ο αριθμός τους υπολογίζεται με το λογισμικό ImageJ (Cell Counter ανάλυση) και η κυτταρική μετανάστευση για την εκάστοτε θεραπεία εκφράζεται ως % ποσοστό ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

Προηγήθηκαν πιλοτικά πειράματα όπου εξετάστηκαν βασικές παράμετροι, προκειμένου να εδραιωθεί η δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης τύπου «Transwell» στα EA.hy926 κύτταρα. Εξετάστηκε η επίστρωση διαφορετικού αριθμού κυττάρων ανά ένθετο: α) 3x10⁴ και β) 10x10⁴ κύτταρα. Παράλληλα, εξετάστηκαν οι εξής συνθήκες στέρισης ορού για 20h:

α) θρεπτικό υλικό σύστασης 2% (v/v) αντιβιοτικά απουσία FBS και β) θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά. Όταν τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πυκνότητα 3×10^4 κύτταρα ανά ένθετο σε θρεπτικό υλικό σύστασης 2% (v/v) αντιβιοτικά απουσία FBS παρατηρήθηκε πολύ μειωμένη κατάσταση συμβολής στο δείγμα rhVEGF (100ng/mL) και στα κύτταρα αναφοράς, η οποία οδήγησε σε αμελητέα κυτταρική μετανάστευση μετά από 20h ακόμη και στο δείγμα θετικού ελέγχου. Όταν τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πυκνότητα 10×10^4 κύτταρα ανά ένθετο σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά παρατηρήθηκε συγκριτικά μεγαλύτερη κατάσταση συμβολής και κυτταρική μετανάστευση μετά από 20h και στα δύο δείγματα. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, επιλέχθηκαν οι εξής πειραματικές συνθήκες: επίστρωση κυττάρων σε πυκνότητα 10×10^4 κύτταρα ανά ένθετο και επώαση σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS και 2% (v/v) αντιβιοτικά για 20h.

3.28. Πειράματα χημικής αναστολής των κινασών MEK1/2 και PI3K στα HCAEC κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-apoE3 για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης/φωσφορυλίωσης και της κυτταρικής μετανάστευσης

Υλικά: Χημικός αναστολέας της κινάσης PI3K LY294002 (Chemicon International/Merk Millipore), χημικός αναστολέας των κινασών MEK1/2 PD98059 (Chemicon International/Merk Millipore), πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 12 και 24 οπών (Greiner Bio-One), διάλυμα DMSO (100%) (BioLabs), αναστροφο μικροσκοπιο Leica DFC-500 με ενσωματωμένη κάμερα ORCA-FLASH4.LT. (Black and white), λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στις Ενότητες 3.14.1 και 3.15.

3.28.1. Πιλοτικά πειράματα ελέγχου της λειτουργικότητας των χημικών αναστολέων των κινασών MEK1/2 και PI3K στα HCAEC κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης

Πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα ελέγχου της λειτουργικότητας του αναστολέα της ενεργοποίησης των κινασών MEK1/2 (PD98059) ή του αναστολέα της κινάσης PI3K (LY294002) σε HCAEC κύτταρα με αναλύσεις ενεργοποίησης των καθοδικών κινασών-στόχων τους, ERK1/2 και AKT, αντίστοιχα. Εξετάστηκε ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκάστοτε αναστολέα (PD: 1μM, 2μM, 5μM, LY: 1μM, 10μM, 25μM, 50μM και 80μM) και διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης (1h και 24h) των κυττάρων με αυτόν, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση του κάθε αναστολέα στο απαιτούμενο χρονικό διάστημα επώασης. Οι δύο αυτές παράμετροι καθορίζουν την

ικανότητα του εκάστοτε αναστολέα να καταστέλλει αποτελεσματικά την ενεργοποίηση των κινασών-στόχων του, χωρίς όμως να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων στα χρονικά σημεία του εκάστοτε πειράματος.

Αναλυτικότερα, για τη μελέτη της λειτουργικότητας του εκάστοτε αναστολέα στο χρονικό διάστημα επώασης 1h ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία: HCAEC επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 12 οπών σε πυκνότητα 10×10^4 κύτταρα ανά οπή σε 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 80% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~24h), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,5mL HBSS (2 φορές) ανά οπή και επωάζονται για 4h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS, 5% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά. Κατόπιν, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με HBSS (1 φορά) και επωάζονται για 1h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 5% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά απουσία FBS που περιέχει τον αναστολέα PD98059 (εξεταζόμενες συγκεντρώσεις: 1μM, 2μM, 5μM) ή LY294002 (εξεταζόμενες συγκεντρώσεις: 1μM, 10μM, 25μM, 50μM και 80μM). Κύτταρα HCAEC που επωάστηκαν για 1h σε θρεπτικό υλικό ίδιας σύστασης που περιείχε DMSO (διαλύτης του αναστολέα PD98059 ή LY294002) αποτέλεσαν το δείγμα αρνητικού ελέγχου.

Αντίστοιχα, για τη μελέτη της λειτουργικότητας των αναστολέων PD98059 και LY294002 στο χρονικό διάστημα επώασης 24h ακολουθείται η εξής πειραματική πορεία: HCAEC επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 12 οπών σε πυκνότητα 25×10^4 κύτταρα ανά οπή σε 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 90-100% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~24h), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με HBSS (2 φορές) ανά οπή και επωάζονται για 16h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά. Κατόπιν, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με HBSS (1 φορά) και επωάζονται για 1h και 24h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,25% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει τον αναστολέα PD98059 (εξεταζόμενες συγκεντρώσεις: 1μM, 2μM και 5μM) ή LY294002 (εξεταζόμενες συγκεντρώσεις: 1μM και 25μM) ή το DMSO.

Πραγματοποιείται λύση των κυττάρων μετά από επώαση με τον αναστολέα PD98059 ή LY294002 ή το DMSO στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις για 1h ή 24h και απομόνωση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (Ενότητα 3.22). Εφαρμόζονται αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Ενότητα 3.24.2) στα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα για τη

μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων και ολικών μορφών των ERK1/2 ή AKT, αντίστοιχα.

3.28.2. Μελέτη της επίδρασης των χημικών αναστολέων των MEK1/2 και PI3K κινασών στην πρωτεϊνική έκφραση/φωσφορυλίωση στα HCAEC κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-αροΕ3 με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western

Για τη μελέτη του ρόλου των MEK1/2 ή PI3K κινασών στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μορίων-τελεστών της κυτταρικής μετανάστευσης (ERK1/2, AKT, p38 MAPK και eNOS) στα HCAEC κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-αροΕ3 για 30min ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία: Κύτταρα HCAEC ίδιας γενιάς (στο 80% της κατάστασης συμβολής) από κάθε μία από τις τρεις 75cm² φλάσκες επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 24 οπών σε πυκνότητα 7×10^4 κύτταρα ανά οπή σε 0,5mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Οι οπές ανά τρεις επιστρώνονται με κύτταρα από διαφορετική φλάσκα. Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 80% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~24h), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,25mL HBSS (2 φορές) ανά οπή και επωάζονται για 4h στους 37°C σε 0,25mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS, 5% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά. Κατόπιν, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με HBSS (1 φορά) και επωάζονται για 1h στους 37°C σε 0,25mL θρεπτικού υλικού σύστασης 5% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά απουσία FBS που περιέχει τον αναστολέα PD98059 (5μM) ή LY294002 (10μM και 25μM). Κύτταρα HCAEC που επώαστηκαν για 1h σε θρεπτικό υλικό ίδιας σύστασης που περιείχε DMSO αποτέλεσαν το δείγμα αρνητικού ελέγχου. Μετά από 1h, προστίθεται στα κύτταρα rHDL-αροΕ3 (100 ή 250μg/mL) ή PBS 1X (δείγμα αναφοράς) χωρίς την απομάκρυνση του εκάστοτε αναστολέα ή του DMSO και ακολουθεί επώαση για 30min στους 37°C.

Η επίδραση της αναστολής των MEK1/2 ή PI3K κινασών στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μορίων-τελεστών της κυτταρικής μετανάστευσης (ERK1/2, AKT, p38 MAPK και eNOS) μελετήθηκε, επίσης, στα HCAEC κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-αροΕ3 για 24h. Ακολουθείται η πειραματική πορεία όπως περιγράφηκε παραπάνω με τις εξής διαφορές: 1) Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 24 οπών σε πυκνότητα 10×10^4 κύτταρα ανά οπή σε πλήρες θρεπτικό υλικό. 2) Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 90-100% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~24h) επωάζονται για 16h σε θρεπτικό υλικό σύστασης 0,5% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά. 3) Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 1h σε 0,25mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,25% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει τον αναστολέα PD98059 (2μM) ή

LY294002 (1 μ M) ή το DMSO. 4) Μετά από 1h, προστίθεται στα κύτταρα rHDL- α ροE3 (100 μ g/mL) ή PBS 1X χωρίς την απομάκρυνση του εκάστοτε αναστολέα ή του DMSO και ακολουθεί επώαση για 24h.

Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα που προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των HCAEC κυττάρων (στην ίδια γενιά). Εφαρμόζονται αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Ενότητα 3.24.2) στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων μετά από έκθεση σε rHDL- α ροE3 ή PBS για 30min ή 24h παρουσία ή απουσία (DMSO) του αναστολέα PD98059 ή LY294002 για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων και ολικών μορφών των ERK1/2, AKT, p38 MAPK και eNOS. Ειδικότερα, αξιολογείται η επίδραση του αναστολέα PD98059 στη φωσφορυλίωση των ERK1/2, και του LY294002 στη φωσφορυλίωση των AKT, p38 MAPK και eNOS.

3.28.3. Μελέτη της επίδρασης των χημικών αναστολέων των ERK1/2 και PI3K κινασών στη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων υπό έκθεση σε rHDL- α ροE3 με δοκιμασίες προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»

Κύτταρα HCAEC ίδιας γενιάς (στο 80% της κατάσταση συμβολής) από κάθε μία από τις τρεις 75cm² φλάσκες επιστρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 12 οπών σε πυκνότητα 25x10⁴ κύτταρα ανά οπή σε 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Οι οπές ανά τρεις επιστρώνονται με κύτταρα από διαφορετική φλάσκα. Όταν τα κύτταρα σε κάθε οπή έχουν πολλαπλασιαστεί στο 90-100% της κατάστασης συμβολής (μετά από ~24h), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,5mL HBSS (2 φορές) και επωάζονται για 16h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά. Κατόπιν, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται, τα κύτταρα ξεπλένονται με HBSS (1 φορά) και επωάζονται για 1h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,25% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει τον αναστολέα PD98059 (2 μ M) ή LY294002 (1 μ M) ή το DMSO (δείγμα αρνητικού ελέγχου). Μετά από 1h, εφαρμόζονται δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα κύτταρα, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.19.1.2. Ειδικότερα, μετά τη δημιουργία χαραγής («πληγής») στην επιφάνεια του μονόστιβου της κυτταροκαλλιέργειας ανά οπή και την απομάκρυνση των αποκολλημένων κυττάρων, προστίθεται στα κύτταρα 0,6mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,25% (v/v) FBS, 1% (v/v) hLPDS και 1% (v/v) αντιβιοτικά που περιέχει τον αναστολέα PD98059 (2 μ M) ή LY294002 (1 μ M) ή το DMSO. Κατόπιν, χορηγείται rHDL- α ροE3 (100 μ g/mL) ή PBS 1X (δείγμα αναφοράς) στα κύτταρα και

ακολουθεί επώαση για 24h στους 37°C. Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα που προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των HCAEC κυττάρων (στην ίδια γενιά). Ο αριθμός των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει στην περιοχή της «πληγής» μετά από 24h επώασης με rHDL-αροΕ3 ή PBS, παρουσία ή απουσία (DMSO) του αναστολέα PD98059 ή LY294002, υπολογίζεται ως % ποσοστό ως προς το δείγμα “PBS+DMSO”.

3.29. Πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-αροΕ3 για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης/φωσφορυλίωσης και κυτταρικής μετανάστευσης

Υλικά: siRNA που στοχεύει το γονίδιο EFNB2 τύπου Silencer EFNB2 siRNA (14268, Ambion/Thermo Fisher Scientific), siRNA τυχαίας ακολουθίας τύπου Silencer Negative control (scrambled) # 1 siRNA (Ambion/Thermo Fisher Scientific), siRNA που στοχεύει το γονίδιο ID1 τύπου Silencer Select ID1 siRNA (s7106, Ambion/Thermo Fisher Scientific), siRNA τυχαίας ακολουθίας τύπου Silencer Select Negative control (scrambled) # 2 siRNA (Ambion/Thermo Fisher Scientific), EFNB2 siRNA 50 ή 20μM, ID1 siRNA 50 ή 20μM, siRNA τυχαίας ακολουθίας 50 ή 20μM, αντιδραστήρια siRNA επιμόλυνσης: 1) λιποφεκταμίνη 2000 (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), 2) λιποφεκταμίνη RNAiMAX (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), 3) Lullaby (OZBiosciences), 4) Viomer BLUE (OriGene), θρεπτικό υλικό Opti-MEM που περιέχει μειωμένη περιεκτικότητα σε ορό (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 24 οπών (Greiner Bio-One), αναστροφο μικροσκόπιο Leica DFC-500 με ενσωματωμένη κάμερα ORCA-FLASH4.LT. (Black and white), λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Τα επιπλέον υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κοινά με αυτά που αναφέρονται στις Ενότητες 3.14.2 και 3.15.

3.29.1. Πιλοτικά πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης των EFNB2 και ID1 στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα

Πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης της EFNB2 (Ephrin B2) και του ID1 (Inhibitor of DNA binding 1) μέσω ενός ειδικού siRNA (μικρού κατασταλτικού RNA) για το εκάστοτε γονίδιο (EFNB2 siRNA και ID1 siRNA, αντίστοιχα) στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα. Κύτταρα που επιμολύνθηκαν με ένα siRNA τυχαίας ακολουθίας (control siRNA) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα αρνητικού ελέγχου. Εξετάστηκαν: α) εύρος συγκεντρώσεων του EFNB2 siRNA ή ID1 siRNA, β) διαφορετικοί χρόνοι επώασεων των HCAEC ή/και EA.hy926 κυττάρων με αυτά (24h, 48h, 72h), και γ) διαφορετικά αντιδραστήρια επιμόλυνσης siRNA: 1) λιποφεκταμίνη 2000, 2) λιποφεκταμίνη RNAiMAX, 3)

Lullaby, 4) Viomer BLUE. Ακολουθήκαν τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας για κάθε αντιδραστήριο επιμόλυνσης. Εφαρμόστηκαν ένας ή δύο κύκλοι επιμόλυνσης (κλασική (συμβατική) ή αντίστροφη επιμόλυνση) των HCAEC ή/και EA.hy926 κυττάρων με το EFNB2 siRNA ή το ID1 siRNA. Ειδικότερα, τα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης της EFNB2 πραγματοποιήθηκαν σε HCAEC κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το EFNB2 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας σε συγκέντρωση 100 ή 200nM για 24h ή 48h με τη χρήση της λιποφεκταμίνης 2000. Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, δύο κύκλοι επιμόλυνσης των HCAEC κυττάρων με το EFNB2 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (200nM) με τη χρήση της λιποφεκταμίνης 2000. Ο δεύτερος κύκλος επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκε 24h μετά τον πρώτο κύκλο (συνολικός χρόνος επιμόλυνσης 48h).

Τα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 πραγματοποιήθηκαν σε HCAEC και EA.hy926 κύτταρα. Κύτταρα HCAEC επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας σε συγκέντρωση 25 ή 50 ή 100nM για 24h ή 48h με τη χρήση της λιποφεκταμίνης 2000. Κύτταρα EA.hy926 επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας σε συγκέντρωση 25 ή 50nM για 48h με τη χρήση της λιποφεκταμίνης RNAiMAX ή του Lullaby. Κύτταρα EA.hy926 υποβλήθηκαν, επίσης, σε αντίστροφη επιμόλυνση με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (25 ή 50nM) για 48h ή 72h με τη χρήση της λιποφεκταμίνης RNAiMAX ή του Viomer BLUE.

Η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης της EFNB2 ή του ID1 στα εκάστοτε εξεταζόμενα χρονικά σημεία της siRNA επιμόλυνσης αξιολογήθηκε με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Ενότητα 3.18.2) στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της EFNB2 ή του ID1, αντίστοιχα. Με βάση τα αποτελέσματα, εξετάστηκε περαιτέρω η επιμόλυνση των EA.hy926 κυττάρων με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας εφαρμόζοντας δύο κύκλους με τη χρήση της λιποφεκταμίνης RNAiMAX για 48h και 72h (Ενότητα 3.29.2).

3.29.2. Επιμόλυνση των EA.hy926 κυττάρων με ID1 siRNA για 48h και 72h

Κύτταρα EA.hy926 επιμολύνονται με το ID1 siRNA ή ένα siRNA τυχαίας ακολουθίας (δείγμα αρνητικού ελέγχου) για 48h ή 72h με τη χρήση του αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνη RNAiMAX. Πραγματοποιούνται δύο κύκλοι επιμόλυνσης με το εκάστοτε siRNA σε συγκέντρωση 50nM:

Πρώτος κύκλος επιμόλυνσης: Τα κύτταρα αρχικά υποβάλλονται σε αντίστροφη επιμόλυνση με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας σε συγκέντρωση 50nM. Ειδικότερα, σε κάθε οπή του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας 24 οπών, 30 pmoles ID1 siRNA ή siRNA τυχαίας

ακολουθίας (1,5μL siRNA 20μM) αραιώνονται σε 98,5μL θρεπτικού υλικού που περιέχει μειωμένη περιεκτικότητα σε ορό (Optimem) και αναμειγνύονται ήπια. Προστίθεται 1μL λιποφεκταμίνης RNAiMAX σε κάθε οπή που περιέχει τα αραιωμένα μόρια siRNA. Ακολουθεί ήπια ανάμειξη και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min, ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX. Κύτταρα EA.hy926 ίδιας γενιάς από κάθε μία από τις τρεις 25cm² φλάσκες (στο 80% κατάσταση συμβολής) αναδιασπείρονται σε πυκνότητα 3,5x10⁴ κύτταρα σε 500μL θρεπτικού υλικού σύστασης 10% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά. Μετά από τα 10min επώασης του εκάστοτε siRNA με τη λιποφεκταμίνη RNAiMAX, προστίθεται σταγόνα-σταγόνα το εναιώρημα των κυττάρων σε πυκνότητα 3,5x10⁴ σε κάθε οπή. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX για 24h στους 37°C. Παράλληλα επιστρώνονται κύτταρα σε πυκνότητα 3,5x10⁴ κύτταρα ανά οπή σε 500μL θρεπτικού υλικού σύστασης 10% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά, προστίθενται 98,5μL Optimem απουσία ή παρουσία 1μL λιποφεκταμίνης RNAiMAX και ακολουθεί επώαση για 24h στους 37°C. Τα κύτταρα αυτά δεν έχουν επιμολυνθεί με siRNA και χρησιμοποιούνται ως δείγματα ελέγχου της ενδογενούς έκφρασης του ID1 (“μη επιμολυσμένα” κύτταρα) και της επίδρασης του αντιδραστηρίου RNAiMAX στην κυτταρική επιβίωση (“εικονικά επιμολυσμένα ή mock” κύτταρα), αντίστοιχα. Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δείγμα ID1 siRNA ή siRNA τυχαίας ακολουθίας ή δείγμα μη επιμολυσμένων ή mock κυττάρων, οι οποίες προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των EA.hy926 κυττάρων (στην ίδια γενιά).

Δεύτερος κύκλος επιμόλυνσης: Την επόμενη μέρα, τα κύτταρα επιμολύνονται εκ νέου με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας σε συγκέντρωση 50nM. Ειδικότερα, για κάθε αντίδραση επιμόλυνσης αραιώνονται 25 pmoles ID1 siRNA ή siRNA τυχαίας ακολουθίας (1,25μL siRNA 20μM) σε 48,75μL Optimem και αναμειγνύονται ήπια. Επίσης, αραιώνεται 1μL λιποφεκταμίνης RNAiMAX σε 49μL Optimem για κάθε μία αντίδραση επιμόλυνσης και αναμειγνύονται ήπια. Στη συνέχεια, προστίθενται τα 50μL αραιωμένης λιποφεκταμίνης RNAiMAX στα 50μL αραιωμένου ID1 siRNA ή siRNA τυχαίας ακολουθίας, αναμειγνύονται ήπια (μίγμα επιμόλυνσης) και επωάζονται για 10min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX.

Μετά από 24h από τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας, τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο 50-60% της κατάστασης συμβολής. Τότε απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό που περιέχει τα σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX ανά οπή και τα κύτταρα ξεπλένονται με 500μL Optimem (1 φορά). Στη συνέχεια, σε κάθε οπή προστίθεται σταγόνα-σταγόνα το μίγμα επιμόλυνσης (100 μL) που περιέχει τα

σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX και 400μL Optimem. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5h στους 37°C. Αντίστοιχα, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα μη επιμολυσμένα και mock κύτταρα, τα κύτταρα ξεπλένονται με Optimem και επώάζονται σε 500μL Optimem για 5h. Μετά από 5h, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα επιμολυσμένα με siRNA κύτταρα και τα μη επιμολυσμένα και mock κύτταρα, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,25mL DPBS 1X (μία φορά) και επώάζονται για 3h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 10% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά. Κατόπιν, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με DPBS 1X (1 φορά) και επώάζονται για 16h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά. Μετά από 16h (24h μετά τον δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης και 48h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης), πραγματοποιείται λύση των επιμολυσμένων με siRNA κυττάρων για 48h, των μη επιμολυσμένων και mock κυττάρων, και απομόνωση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (Ενότητα 3.16).

Αντίστοιχα, πραγματοποιούνται πειράματα επιμόλυνσης των EA.hy926 κυττάρων με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας για 72h. Τα κύτταρα αρχικά υποβάλλονται σε αντίστροφη επιμόλυνση με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (50nM) και μετά από 24h επιμολύνονται εκ νέου ακολουθώντας την πορεία που περιγράφεται παραπάνω. Μετά από 5h από το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης, προστίθεται στα κύτταρα 1mL θρεπτικού υλικού σύστασης 10% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά και ακολουθεί επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX για 19h στους 37°C. Αντίστοιχα, στα μη επιμολυσμένα κύτταρα προστίθεται 1mL θρεπτικού υλικού ίδιας σύστασης και ακολουθεί επώαση για 19h. Την επόμενη μέρα, 24h μετά το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης (48h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης) απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό που περιέχει τα σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX από τα επιμολυσμένα με siRNA κύτταρα, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,25mL DPBS 1X (1 φορά) και επώάζονται για 8h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 10% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά. Αντίστοιχες διαδικασίες πραγματοποιούνται και στα μη επιμολυσμένα κύτταρα. Μετά από 8h (32h μετά το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης και 56h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, γίνεται έκπλυση των κυττάρων με DPBS 1X (1 φορά) και ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 16h στους 37°C σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά. Μετά από 16h (48h μετά το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης και 72h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης), πραγματοποιείται λύση των επιμολυσμένων με siRNA κυττάρων για 72h και των μη επιμολυσμένων κυττάρων, και απομόνωση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (Ενότητα 3.22).

Εφαρμόζονται αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Ενότητα 3.24.2) στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας για 48h και 72h (από τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης) και των μη επιμολυσμένων και mock κυττάρων για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ID1. Με τον τρόπο αυτό αξιολογείται η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 στα εκάστοτε εξεταζόμενα χρονικά σημεία.

3.29.3. Ταυτόχρονη επιμόλυνση των EA.hy926 κυττάρων με ID1 siRNA για 72h ή 96h και έκθεση σε rHDL-apoE3 για 24h

EA.hy926 κύτταρα επιμολύνονται με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας για 48h ή 72h με τη χρήση της λιποφεκταμίνης RNAiMAX εφαρμόζοντας δύο κύκλους επιμόλυνσης (βλ. Ενότητα 3.29.2). Μετά από 48h ή 72h από τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης, τα κύτταρα επωάζονται με rHDL-apoE3 ή PBS για 24h (συνολικός χρόνος siRNA επιμόλυνσης 72h ή 96h, αντίστοιχα). Ειδικότερα, στη ταυτόχρονη επιμόλυνση των κυττάρων με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας για 72h ή 96h και έκθεση σε rHDL-apoE3 για 24h ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία: Τα κύτταρα επιμολύνονται με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (50nM) για 48h ή 72h (από τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης) (βλ. Ενότητα 3.29.2). Στη συνέχεια, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,25mL DPBS 1X (μία φορά) και επωάζονται σε 0,35mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS απουσία αντιβιοτικών που περιέχει rHDL-apoE3 (100 µg/mL) ή PBS 1X (δείγμα αναφοράς) για 24h στους 37°C.

Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα που προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες κυττάρων (στην ίδια γενιά). Πραγματοποιείται λύση των κυττάρων και απομόνωση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (Ενότητα 3.22). Εφαρμόζονται αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Ενότητα 3.24.2) στα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ID1.

3.29.4. Επώαση των επιμολυσμένων με ID1 siRNA EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης με δοκιμασίες προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής»

Κύτταρα EA.hy926 υποβάλλονται σε αντίστροφη επιμόλυνση με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (50nM) και μετά από 24h επιμολύνονται εκ νέου (βλ. Ενότητα 3.29.2). Μετά από 32h από το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης (56h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης) (βλ. Ενότητα 3.29.2), αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται

με 0,25mL DPBS 1X (1 φορά) και επωάζονται σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά για 16h στους 37°C. Μετά από 16h (48h μετά το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης και 72h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης), εφαρμόζονται δοκιμασίες προσομοίωσης «επούλωσης πληγής» στα κύτταρα, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.25.2.2. Ειδικότερα, μετά τη δημιουργία χαραγής («πληγής») στην επιφάνεια του μονόστιβου της κυτταροκαλλιέργειας ανά σπή και απομάκρυνση των αποκολλημένων κυττάρων, τα κύτταρα επωάζονται σε 0,35mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS απουσία αντιβιοτικών που περιέχει rHDL-apoE3 (100μg/mL) ή PBS 1X (δείγμα αναφοράς) για 24h στους 37°C. Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα που προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των EA.hy926 κυττάρων (στην ίδια γενιά). Ο αριθμός των επιμολυσμένων κυττάρων με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (συνολικός χρόνος επιμόλυνσης 96h) που έχουν μεταναστεύσει στην περιοχή «πληγής» μετά από 24h επώασης με rHDL-apoE3 ή PBS υπολογίζεται ως % ποσοστό ως προς το δείγμα "siRNA τυχαίας ακολουθίας+PBS".

3.29.5. Επώαση των επιμολυσμένων με ID1 siRNA EA.hy926 κυττάρων με rHDL-apoE3 για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης/φωσφορυλίωσης με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western

Κύτταρα EA.hy926 υποβάλλονται σε αντίστροφη επιμόλυνση με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (50nM) και μετά από 24h επιμολύνονται εκ νέου (βλ. Ενότητα 3.29.2). Μετά από 24h από το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης (48h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης) (βλ. Ενότητα 3.29.2), απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό που περιέχει τα σύμπλοκα siRNA-λιποφεκταμίνης RNAiMAX, τα κύτταρα ξεπλένονται με 0,25mL DPBS 1X (1 φορά) και επωάζονται σε 0,5mL θρεπτικού υλικού σύστασης 10% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά για 24h στους 37°C. Μετά από 24h (48h μετά το δεύτερο κύκλο επιμόλυνσης ή 72h μετά τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης), αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με DPBS 1X (1 φορά) και επωάζονται σε 0,25mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS που δεν περιέχει αντιβιοτικά για 4h στους 37°C. Μετά από 4h, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με DPBS (1 φορά) και ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε 0,25mL θρεπτικού υλικού σύστασης 0,5% (v/v) FBS απουσία αντιβιοτικών που περιέχει rHDL-apoE3 (100 μg/mL) ή PBS 1X (δείγμα αναφοράς) για 30min στους 37 °C. Χρησιμοποιούνται τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία που προήλθαν από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες των EA.hy926 κυττάρων (στην ίδια γενιά).

Στο τέλος της επώασης, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων ανά οπή και απομόνωση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (Ενότητα 3.22). Εφαρμόζονται αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Ενότητα 3.24.2) στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων που επιμόλυνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (συνολικός χρόνος επιμόλυνσης 76h) και κατόπιν επώαστηκαν με rHDL-apoE3 ή PBS (30min) για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων και ολικών μορφών των ERK1/2 και AKT.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Έκφραση και απομόνωση της αροΕ3 του ανθρώπου σε βακτηριακό σύστημα E.Coli και καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας

4.1.1. Έκφραση και απομόνωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-αρoE3 σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων E.Coli

Η έκφραση της wt αρoE3 του ανθρώπου πραγματοποιήθηκε μέσω μετασχηματισμού των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.Coli BL21-Gold (DE3) με τον πλασμιδιακό φορέα «pET32a-E3wt/3C» [462, 463]. Ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει τον υποκινητή T7 που επιτρέπει την έκφραση της χιμαιρικής με την ετικέτα θειορεδοξίνης (Trx 6 His-tag) αρoE3 (Trx-αρoE3) σε υψηλά επίπεδα στο διαλυτό κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων, κατόπιν επώασης των βακτηριακών κυττάρων με IPTG (2h) [462, 463]. Τα δείγματα που συνελέχθησαν από τις βακτηριακές καλλιέργειες πριν και μετά την επαγωγή έκφρασης της Trx-αρoE3 με IPTG αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (v/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης (Εικόνα 4.1A). Στην Εικόνα 4.1A παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της επαγωγής της έκφρασης της χιμαιρικής Trx-αρoE3 σε δύο βακτηριακές καλλιέργειες πριν και μετά την επώαση με IPTG. Η αρoE3 έχει μοριακό βάρος 34 kDa και η ετικέτα Trx-ιστιδίνης (Trx-6 His-tag) έχει μοριακό βάρος 18 kDa. Επομένως, η 6 His-tagged χιμαιρική Trx-αρoE3 που παράγουν τα βακτηριακά κύτταρα μετά την επαγωγή με IPTG έχει μοριακό βάρος 52kDa. Πράγματι, και στις δύο βακτηριακές καλλιέργειες μετά την επαγωγή με IPTG εμφανίζεται έντονη η ζώνη με μοριακό βάρος 52kDa που αντιπροσωπεύει τη χιμαιρική πρωτεΐνη. Η ζώνη αυτή εμφανίζεται σε συγκριτικά πολύ χαμηλότερη ένταση ή απουσιάζει από τις δύο καλλιέργειες πριν την επαγωγή με IPTG. Συμπερασματικά, η επαγωγή της έκφρασης της χιμαιρικής Trx-αρoE3 στα βακτηριακά κύτταρα ήταν επιτυχής.

Μετά την έκφραση της χιμαιρικής Trx-αρoE3 από τα βακτηριακά κύτταρα ακολούθησε λύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση του βακτηριακού λύματος και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος του λύματος. Η Trx οδηγεί την παραγόμενη πρωτεΐνη στο διαλυτό κλάσμα μετά τη λύση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων, ενώ το αδιάλυτο κλάσμα του λύματος περιέχει την αδιάλυτη πρωτεΐνη (inclusion bodies) [462, 463]. Τα δείγματα που συνελέχθησαν από το λύμα των βακτηριακών κυττάρων τα οποία εκφράζουν την Trx-αρoE3 πρωτεΐνη (Δείγμα 1) και το διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού λύματος μετά τη φυγοκέντρηση (Δείγμα 2) αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12% (v/v)), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της απομόνωσης της χιμαιρικής Trx-αρoE3 πρωτεΐνης

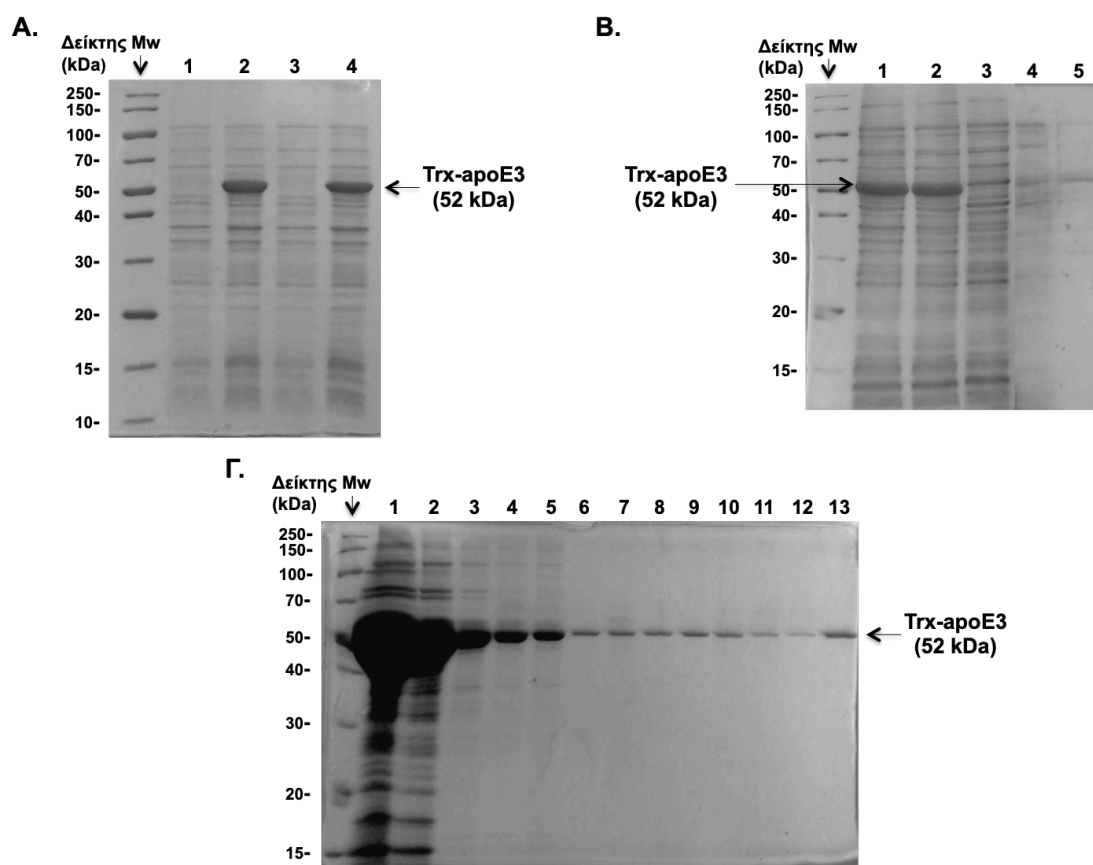
(Εικόνα 4.1B). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1B, η Trx-αροΕ3 πρωτεΐνη εντοπίζεται στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού λύματος (Δείγμα 2).

4.1.2. Καθαρισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου

Μετά την απομόνωση του κλάσματος της διαλυτής Trx-αροΕ3 πρωτεΐνης (Ενότητα 4.1.1), ακολούθησε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη ρητίνης νικελίου [462, 463]. Η ύπαρξη της ετικέτας έξι ιστιδινών (6 x His-tag) στην περιοχή σύνδεσης μεταξύ της Trx και της αροΕ3 διευκολύνει τον καθαρισμό της Trx-αροΕ3 μέσω στήλης ρητίνης νικελίου (Ni-NTA). Αρχικά, συλλέγεται το διάλυμα διέλευσης flow-through το οποίο περιέχει πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη ρητίνη Ni-NTA της στήλης λόγω απουσίας ιστιδίνης (Εικόνα 4.1B). Έπειτα, η ρητίνη Ni-NTA, στην οποία έχει προσδεθεί με υψηλή συγγένεια η Trx-αροΕ3 λόγω παρουσίας της ετικέτας ιστιδίνης, εκπλένεται με ρυθμιστικά διαλύματα 10mM και 20mM ιμιδαζολίου, ώστε να απομακρυνθούν από τη στήλη οι πρωτεΐνες που έχουν δεσμευθεί μη ειδικά στη ρητίνη ή οι ελαφρώς συνδεδεμένες στη ρητίνη πρωτεΐνες (Εικόνα 4.1B). Η έκλυση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Trx-αροΕ3 από τη στήλη πραγματοποιείται με έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA με ρυθμιστικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (300mM, 500mM και 1M), και το εκλουόμενο διάλυμα συλλέγεται σε κλάσματα (Εικόνα 4.1Γ). Η αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου προκαλεί την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που φέρουν ετικέτα ιστιδίνης από τη ρητίνη Ni-NTA, και συνεπώς την έκλυση της 6 His-tagged χιμαιρικής Trx-αροΕ3, καθώς το ιμιδαζόλιο εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης με το νικέλιο συγκριτικά με την ιστιδίνη.

Τα δείγματα που συνελέχθησαν από το διάλυμα διέλευσης flow-through, τα εκλουόμενα διαλύματα μετά από έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA με διαλύματα 10mM και 20mM ιμιδαζολίου και τα κλάσματα έκλυσης κατά τον καθαρισμό της Trx-αροΕ3 αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12% (v/v)), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία του καθαρισμού της πρωτεΐνης (Εικόνα 4.1B-Γ). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1B, το διάλυμα διέλευσης flow-through (Δείγμα 3) και τα πρωτεϊνικά διαλύματα έκλυσης με 10mM και 20mM ιμιδαζόλιο (Δείγματα 4 και 5, αντίστοιχα) περιέχουν αναμενόμενα ελάχιστη ποσότητα της Trx-αροΕ3 πρωτεΐνης. Η μεγαλύτερη ποσότητα της Trx-αροΕ3 εκλύεται με το διάλυμα συγκέντρωσης 300mM ιμιδαζολίου, και ειδικότερα στα κλάσματα 1 έως 5 (Εικόνα 4.1Γ, Δείγματα 1-5). Μικρότερη ποσότητα Trx-αροΕ3, αλλά συγκριτικά πιο καθαρή πρωτεΐνη, περιέχεται στα κλάσματα έκλυσης 6 έως 8 με το διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 4.1Γ, Δείγματα 6-8). Τα κλάσματα έκλυσης 1 έως 4 με το διάλυμα 500mM

ιμιδαζολίου περιέχουν ακόμη λιγότερη ποσότητα καθαρής Trx-αποE3 πρωτεΐνης (Εικόνα 4.1Γ, Δείγματα 9-12). Επομένως, τα κλάσματα έκλουσης της Trx-αποE3 από 1 έως 5 με διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου ενώθηκαν και υπέστησαν διαπύδιση προς απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Τα κλάσματα της χιμαιρικής πρωτεΐνης από 6 έως 8 που εκλούστηκαν με το διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου, καθώς και τα πρωτεϊνικά κλάσματα έκλουσης από 1 έως 4 με το διάλυμα 500mM ιμιδαζολίου δεν προχώρησαν σε διαπύδιση επειδή περιείχαν συγκριτικά πολύ μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης. Η Trx-αποE3 εκλούστηκε σε μικρή ποσότητα με το διάλυμα 1M ιμιδαζολίου, και συνεπώς μικρή ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης έχει κατακρατηθεί από τη ρητίνη νικελίου της στήλης (Εικόνα 4.1Γ, Δείγμα 13). Μετά από την ολοκλήρωση της διαπύδισης, ποσοτικοποιήθηκε η συνολική ποσότητα της παραχθείσας χιμαιρικής πρωτεΐνης, η οποία τυπικά σε κάθε παραγωγή ήταν περίπου 25mg.



Εικόνα 4.1: Έκφραση και απομόνωση της χιμαιρικής Trx-αποE3 σε βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* και καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου. Ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (12% v/v) των δειγμάτων από τα διαφορετικά στάδια που ακολουθήθηκαν για την έκφραση (A) της χιμαιρικής Trx-αποE3 (52kDa) στις καλλιέργειες των μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων, την απομόνωση (B) και την έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη ρητίνης νικελίου (Γ).

A) Δείγμα 1: Καλλιέργεια A βακτηριακών κυττάρων πριν την επαγωγή με IPTG, Δείγμα 2: Καλλιέργεια A βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή με IPTG, Δείγμα 3: Καλλιέργεια B βακτηριακών κυττάρων πριν την επαγωγή με IPTG, Δείγμα 4: Καλλιέργεια B βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή με IPTG.

B) Δείγμα 1: Λύμα βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν τη χιμαιρική Trx-aroE3, Δείγμα 2: Διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού λύματος, Δείγμα 3: Πρωτεϊνικό διάλυμα διέλευσης flow-through, Δείγμα 4: Πρωτεϊνικό διάλυμα έκλυσης με διάλυμα πλύσης 10mM ιμιδαζολίου, Δείγμα 5: Πρωτεϊνικό διάλυμα έκλυσης με διάλυμα πλύσης 20mM ιμιδαζολίου.

Γ) Δείγμα 1 έως 8: Κλάσματα έκλυσης της χιμαιρικής Trx-aroE3 από 1 έως 8 με διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου, Δείγμα 9 έως 12: Κλάσματα έκλυσης της χιμαιρικής Trx-aroE3 από 1 έως 4 με διάλυμα 500mM ιμιδαζολίου, Δείγμα 13: Κλάσμα έκλυσης της χιμαιρικής Trx-aroE3 με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου.

4.1.3. Απομόνωση της απαλλαγμένης από την ετικέτα θειορεδοξίνης-ιστιδίνης αροE3 με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου

Η αποκοπή της ετικέτας θειορεδοξίνης-ιστιδίνης «Trx-6 His-tag» από την απομονωμένη χιμαιρική αροE3 (Ενότητα 4.1.2) πραγματοποιήθηκε μετά την επώαση της πρωτεΐνης με την His-3C πρωτεάση [462, 463]. Η επιτυχία της αντίδρασης πέψης της Trx-aroE3 αξιολογήθηκε μέσω ανάλυσης των δειγμάτων της απομονωμένης χιμαιρικής Trx-aroE3 (άκοπη αροE3) μετά τη διαπύδιση και της αροE3 μετά από την πέψη με την His-3C πρωτεάση με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% (v/v) (Εικόνα 4.2). Σύμφωνα με την Εικόνα 4.2, η αντίδραση πέψης της χιμαιρικής Trx-aroE3 από την His-3C πρωτεάση ήταν επιτυχής. Στο δείγμα της άκοπης αροE3 (Δείγμα 1) εντοπίζεται η ζώνη της χιμαιρικής Trx-aroE3 σε μοριακό βάρος 52kDa. Στο δείγμα της αροE3 αμέσως μετά από την αντίδραση πέψης (Δείγμα 2) εμφανίζεται μία ζώνη 34kDa που αντιστοιχεί στην αροE3 μετά την αποκοπή της ετικέτας Trx-6 His. Στο ίδιο δείγμα εμφανίζεται, όπως αναμενόταν, και μία ζώνη 18kDa που αντιπροσωπεύει την αποκομμένη ετικέτα Trx-6 His από τη χιμαιρική Trx-aroE3, καθώς και η ζώνη της His-3C πρωτεάσης σε μοριακό βάρος 24kDa (Εικόνα 4.2).

Η απαλλαγμένη από την ετικέτα Trx-6 His αροE3 απομονώθηκε από τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης πέψης (αποκομμένη ετικέτα Trx-6 His, His-3C πρωτεάση και τυχόν άκοπη χιμαιρική Trx-aroE3) με ένα δεύτερο βήμα καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 4.2) [462, 463]. Κατά τη διέλευση του διαλύματος πέψης από τη στήλη, κατακρατούνται από τη

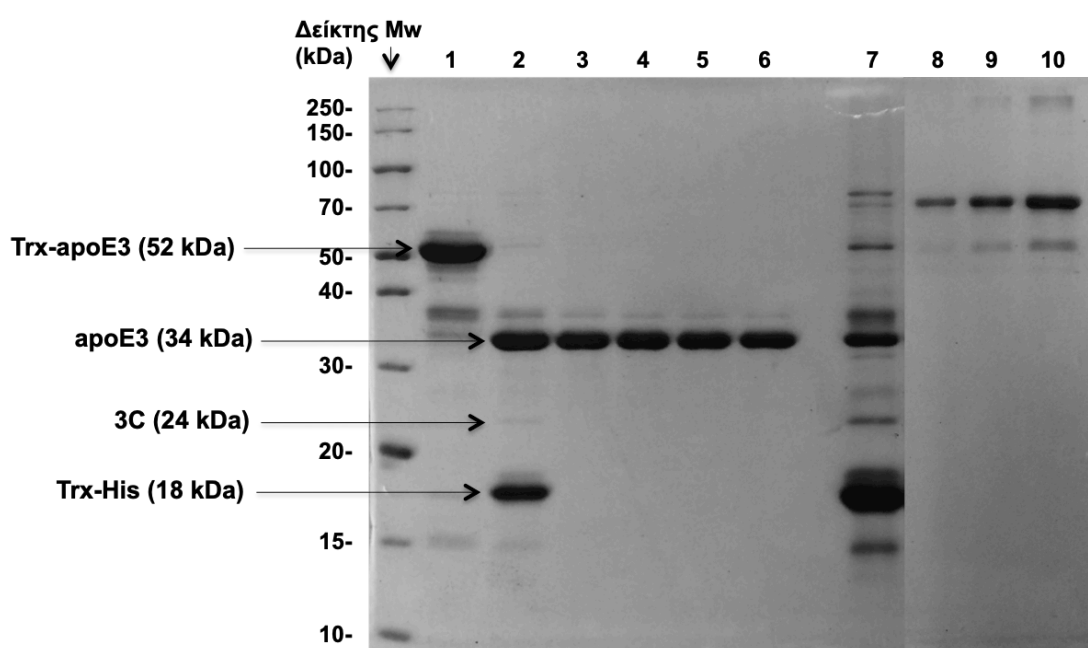
ρητίνη νικελίου η αποκομμένη ετικέτα Trx-6 His (18kDa), η His-3C πρωτεάση (24kDa) που, επίσης, φέρει ετικέτα ιστιδίνης και η χιμαιρική Trx-αροE3 (52kDa) που τυχόν δεν έχει πεφθεί από την His-3C πρωτεάση (άκοπη χιμαιρική Trx-αροE3 σε μικρή ποσότητα). Η αροE3 (34kDa) που έχει προκύψει από την πέψη της χιμαιρικής Trx-αροE3 με την His-3C πρωτεάση δε φέρει την ετικέτα ιστιδίνης 6 His. Ως εκ τούτου, η αροE3 διέρχεται από τη στήλη χωρίς να κατακρατείται από τη ρητίνη νικελίου και συλλέγεται καθαρή στο διάλυμα διεύλευσης (flow-through). Η διέλευση του διαλύματος της απαλλαγμένης από την ετικέτα Trx-6 His αροE3 από τη στήλη επαναλήφθηκε τέσσερις φορές μετά από τη σταδιακή προσθήκη ρητίνης νικελίου στο διάλυμα της αντίδρασης πέψης. Η έκλυση των πρωτεϊνών που έχουν κατακρατηθεί από τη ρητίνη νικελίου της στήλης λόγω παρουσίας ετικέτας ιστιδίνης πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 1M ιμιδαζολίου.

Τα δείγματα που συνελέχθησαν από τα διαδοχικά διαλύματα διέλευσης από τη στήλη της απαλλαγμένης από την ετικέτα Trx-6 His αροE3 (flow-through διαλύματα 1 έως 4, Δείγματα 3 έως 6) και του πρωτεϊνικού διαλύματος έκλυσης με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου (Δείγμα 7) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% (v/v), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία του καθαρισμού της αροE3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης (Εικόνα 4.2). Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκαν και πρότυπα διαλύματα BSA γνωστής ποσότητας - 0,5, 1 και 2 μg - (Δείγματα 8 έως 10) για την ποσοτικοποίηση της παραχθείσας αροE3 με τη χρήση του λογισμικού Image J.

Στην Εικόνα 4.2 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα του καθαρισμού της απαλλαγμένης από την ετικέτα Trx-6 His αροE3 από τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης πέψης (αποκομμένη ετικέτα Trx-6 His, His-3C πρωτεάση και τυχόν άκοπη χιμαιρική Trx-αροE3) μέσω στήλης ρητίνης νικελίου. Η αροE3 απαλλαγμένη από την ετικέτα Trx-6 His εκλούστηκε καθαρή στο τέταρτο διάλυμα flow-through (Δείγμα 6), καθώς στο δείγμα αυτό εμφανίζεται η ζώνη 34kDa που αντιστοιχεί στην αροE3, ενώ απουσιάζει η ζώνη της αποκομμένης ετικέτας Trx-6 His (18kDa), της His-3C πρωτεάσης (24kDa) και της τυχόν άκοπης χιμαιρικής Trx-αροE3 (52kDa) (Εικόνα 4.2). Οι τρεις αυτές ζώνες (18kDa, 24kDa και 52kDa) εντοπίζονται στο πρωτεϊνικό διάλυμα που εκλούστηκε με το διάλυμα 1M ιμιδαζολίου (Δείγμα 7), καθώς η συγκέντρωση αυτή του ιμιδαζολίου οδηγεί στην έκλυση της ετικέτας Trx-6 His, της His-3C πρωτεάσης και της τυχόν άκοπης χιμαιρικής Trx-αροE3 (σε μικρή ποσότητα) καθώς και άλλων πρωτεϊνών που έχουν κατακρατηθεί από τη ρητίνη νικελίου της στήλης λόγω παρουσίας ιστιδίνης (Εικόνα 4.2). Στο ίδιο δείγμα (Δείγμα 7) εκλούστηκε μία ποσότητα της απαλλαγμένης από την ετικέτα Trx-6 His αροE3 (34kDa) που έχει προσδεθεί μη ειδικά στη ρητίνη νικελίου της στήλης, η οποία είναι συγκριτικά αρκετά

μικρότερη από την apoE3 που εκλούστηκε στο τέταρτο διάλυμα flow-through (Δείγμα 6) (Εικόνα 4.2). Η καθαρότητα της παραχθείσας apoE3 στο τέταρτο διάλυμα flow-through ήταν τυπικά περίπου 95%, όπως προσδιορίστηκε με πυκνομετρική σάρωση του αντίστοιχου δείγματος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ.

Μετά τον καθαρισμό, η apoE3 (τέταρτο διάλυμα flow-through) υπέστη διαπύδιση προς την επαναδιάταξή της, και κατόπιν φυγοκέντρωση ώστε να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα της πρωτεΐνης. Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της παραχθείσας apoE3 στο υπερκείμενο. Τυπικά, η ποσότητα της apoE3 σε κάθε παραγωγή ανέρχονταν περίπου στα 15mg.



Εικόνα 4.2: Πέψη της χμαιρικής Trx-apoE3 με την His-3C πρωτεάση και καθαρισμός της απαλλαγμένης από την ετικέτα θειορεδοξίνης-ιστιδίνης apoE3 από τα προϊόντα της αντίδρασης πέψης με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου. Ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (12% v/v): 1) Της χμαιρικής Trx-apoE3 (52kDa) έπειτα από τον πρώτο καθαρισμό (Δείγμα 1). 2) Της απαλλαγμένης από την ετικέτα Trx-6 His (18kDa) apoE3 μετά από την πέψη με τη 3C-His πρωτεάση (24kDa) (Δείγμα 2). 3) Των διαδοχικών δειγμάτων διέλευσης (flow-through) από 1 έως 4 της απαλλαγμένης από την ετικέτα Trx-6 His apoE3 (34kDa) από τη στήλη (Δείγματα 3 έως 6, αντίστοιχα). 4) Του πρωτεϊνικού διαλύματος έκλυσης με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου (Δείγμα 7). Δείγματα 8 έως 10: Πρότυπα διαλύματα BSA γνωστής ποσότητας 0,5, 1 και 2 μg, αντίστοιχα).

4.2. Έκφραση και απομόνωση της His-3C πρωτεάσης σε σύστημα σε βακτηριακό σύστημα E.Coli και καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας

4.2.1. Έκφραση και απομόνωση της His-3C πρωτεάσης σε σύστημα βακτηριακών κυττάρων E.Coli

Η έκφραση της His-3C πρωτεάσης πραγματοποιήθηκε μέσω μετασχηματισμού των BL21-Gold DE3 επιδεικτικών κυττάρων E.Coli με τον πλασμιδιακό φορέα pET-24/His-3C που φέρει το γονίδιο έκφρασης της 3C πρωτεάσης συζευγμένο με μία ετικέτα 6 ιστιδινών [462, 463]. Η επαγωγή της έκφρασης της His-3C πρωτεάσης έγινε μετά από επώαση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων με IPTG (2h). Τα δείγματα που συνελέχθησαν από τις βακτηριακές καλλιέργειες πριν και μετά την επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης με IPTG αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (15% (v/v)), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της έκφρασης της His-3C πρωτεάσης (Εικόνα 4.3A). Στην Εικόνα 4.3A παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της επαγωγής της έκφρασης της His-3C πρωτεάσης σε δύο βακτηριακές καλλιέργειες πριν και μετά την επώαση με IPTG. Και στις δύο καλλιέργειες μετά την επαγωγή με IPTG εμφανίζεται έντονη η ζώνη με μοριακό βάρος 24kDa που αντιστοιχεί στην His-3C πρωτεΐνη. Η ζώνη αυτή εμφανίζεται σε συγκριτικά πολύ χαμηλότερη ένταση στις δύο καλλιέργειες πριν την επαγωγή με IPTG. Συμπερασματικά, η επαγωγή της έκφρασης της His-3C πρωτεάσης στα βακτηριακά κύτταρα ήταν επιτυχής.

Μετά την έκφραση της His-3C πρωτεΐνης από τα βακτηριακά κύτταρα ακολούθησε λύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση του βακτηριακού λύματος και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος του λύματος [462, 463]. Τα δείγματα που συνελέχθησαν από το λύμα των βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν την His-3C πρωτεάση και το διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα του βακτηριακού λύματος μετά τη φυγοκέντρηση αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (15% (v/v)), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της απομόνωσης της His-3C πρωτεΐνης (Εικόνα 4.3A). Με βάση την Εικόνα 4.3A, η μεγαλύτερη ποσότητα της His-3C πρωτεάσης εντοπίζεται στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού λύματος, ενώ το αδιάλυτο κλάσμα του λύματος περιέχει την αδιάλυτη πρωτεΐνη (inclusion bodies).

4.2.2. Καθαρισμός της His-3C πρωτεάσης με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης ρητίνης νικελίου

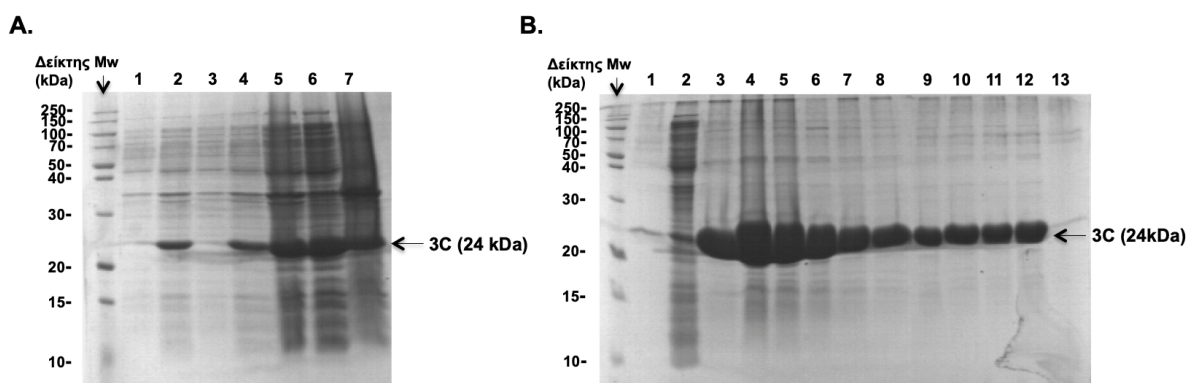
Μετά την απομόνωση του κλάσματος της διαλυτής His-3C πρωτεάσης (Ενότητα 4.2.1), ακολούθησε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη ρητίνης νικελίου (Εικόνα 4.3B) [462, 463]. Αρχικά, συλλέγεται το διάλυμα διέλευσης flow-through το οποίο περιέχει πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη ρητίνη Ni-NTA της στήλης λόγω απουσίας ιστιδίνης. Έπειτα, η ρητίνη Ni-NTA, στην οποία έχει προσδεθεί με υψηλή

συγγένεια η His-3C πρωτεάση λόγω παρουσίας της ετικέτας ιστιδίνης, εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα 20mM ιμιδαζολίου, ώστε να απομακρυνθούν από τη στήλη οι πρωτεΐνες που έχουν δεσμευθεί μη ειδικά στη ρητίνη ή οι ελαφρώς συνδεδεμένες στη ρητίνη πρωτεΐνες. Η έκλυση της His-3C πρωτεΐνης από τη ρητίνη Ni-NTA της στήλης πραγματοποιείται με ρυθμιστικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (300mM, 500mM και 1M), και το εκλούόμενο διάλυμα συλλέγεται σε κλάσματα. Η αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου προκαλεί την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που φέρουν ετικέτα ιστιδίνης από τη ρητίνη Ni-NTA, και συνεπώς την έκλυση της His-3C πρωτεάσης, καθώς το ιμιδαζόλιο σχηματίζει ισχυρότερους δεσμούς με το νικέλιο συγκριτικά με την ιστιδίνη.

Τα δείγματα που συνελέχθησαν από το διάλυμα διέλευσης flow-through, το εκλούόμενο διάλυμα μετά από έκπλυση της ρητίνης Ni-NTA με διάλυμα 20mM ιμιδαζολίου και τα κλάσματα έκλυσης κατά τον καθαρισμό της His-3C πρωτεάσης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (15% (v/v)), προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία του καθαρισμού της πρωτεΐνης (Εικόνα 4.3B). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3B, το διάλυμα διέλευσης flow-through και το πρωτεϊνικό διάλυμα έκλυσης με διάλυμα 20mM ιμιδαζολίου περιέχουν αναμενόμενα ελάχιστη ποσότητα His-3C πρωτεάσης. Η μεγαλύτερη ποσότητα της His-3C πρωτεΐνης εκλύεται με το διάλυμα συγκέντρωσης 300mM ιμιδαζολίου, και ειδικότερα στα κλάσματα 1 έως 5 (Εικόνα 4.3B, Δείγματα 3 έως 7). Μικρότερη ποσότητα His-3C πρωτεάσης, αλλά συγκριτικά πιο καθαρή πρωτεΐνη, περιέχεται στα κλάσματα έκλυσης 6 έως 8 με το διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου, καθώς και στα κλάσματα έκλυσης 1 έως 2 με το διάλυμα 500mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 4.3B, Δείγματα 8-10 και Δείγματα 11-12, αντίστοιχα). Επομένως, τα κλάσματα έκλυσης της His-3C πρωτεάσης από 1 έως 5 με διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου ενώθηκαν και υπέστησαν διαπύδιση προς απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Αντίστοιχα, ενώθηκαν τα κλάσματα της His-3C πρωτεΐνης από 6 έως 8 που εκλούστηκαν με το διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου, όπως και τα πρωτεϊνικά κλάσματα έκλυσης από 1 έως 2 με το διάλυμα 500mM ιμιδαζολίου, και υπέστησαν διαπύδιση. Η His-3C πρωτεάση εκλούστηκε σε ελάχιστη σχεδόν αμελητέα ποσότητα με το διάλυμα 1M ιμιδαζολίου, και συνεπώς ελάχιστη ποσότητα της πρωτεΐνης έχει κατακρατηθεί από τη ρητίνη νικελίου της στήλης (Εικόνα 4.3B).

Μετά από την ολοκλήρωση της διαπύδισης, τα διαλύματα της His-3C πρωτεάσης φυγοκεντρήθηκαν προς απομάκρυνση τυχόν συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης. Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της παραχθείσας His-3C πρωτεάσης σε κάθε ένα από τα τρία διαλύματα της πρωτεΐνης (υπερκείμενα), και το πρώτο διάλυμα

εμφάνισε αναμενόμενα την υψηλότερη συγκέντρωση: 1) Κλάσματα έκλουσης 1-5 με 300mM ιμιδαζόλιο: 1,3mg/mL, 2) Κλάσματα έκλουσης 6-8 με 300mM ιμιδαζόλιο: 0,3mg/mL και 3) Κλάσματα έκλουσης 1-2 με 500mM ιμιδαζόλιο: 0,24mg/mL. Η συνολική ποσότητα της παραχθείσας His-3C πρωτεΐνης από 1L βακτηριακής καλλιέργειας ήταν περίπου 15mg. Η His-3C πρωτεΐνη που εκλούστηκε στα κλάσματα 1-5 με 300mM ιμιδαζόλιο χρησιμοποιήθηκε για την πέψη της χημεικής Trx-aroE3 (Ενότητα 4.1.3).



Εικόνα 4.3: Έκφραση και απομόνωση της His-3C πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα E.Coli και καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη ρητίνης νικελίου. Ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (15% v/v) των δειγμάτων από τα διαφορετικά στάδια που ακολουθήθηκαν για την έκφραση και απομόνωση της His-3C πρωτεΐνης (24kDa) από τις καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων (A), καθώς και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης μέσω στήλης ρητίνης νικελίου (B).

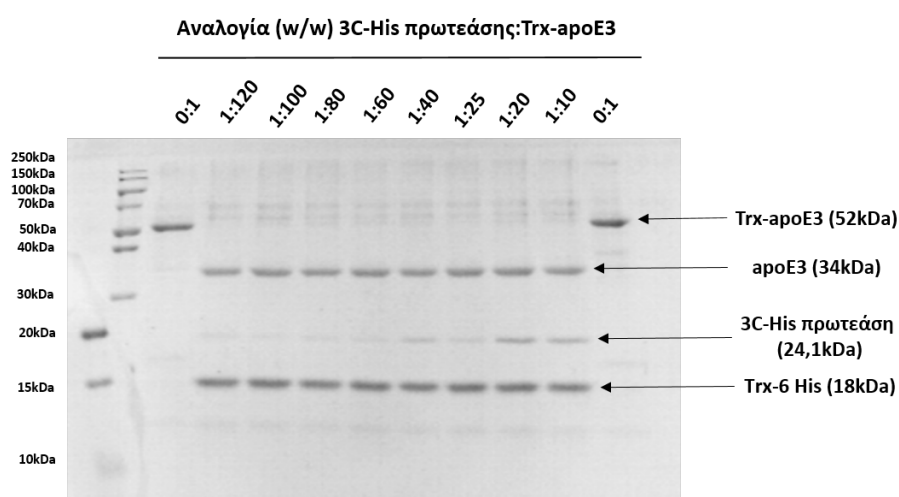
A) Δείγμα 1: Καλλιέργεια A βακτηριακών κυττάρων πριν την επαγωγή με IPTG. Δείγμα 2: Καλλιέργεια A βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή με IPTG, Δείγμα 3: Καλλιέργεια B Καλλιέργεια B βακτηριακών κυττάρων πριν την επαγωγή με IPTG, Δείγμα 4: Καλλιέργεια B βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή με IPTG, Δείγμα 5: Λύμα βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν την His-3C πρωτεΐνη, Δείγμα 6: Διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού λύματος, Δείγμα 7: Αδιαλυτό κλάσμα του βακτηριακού λύματος.

B) Δείγμα 1: Πρωτεϊνικό διάλυμα διέλευσης flow-through, Δείγμα 2: Πρωτεϊνικό διάλυμα έκλουσης με διάλυμα πλύσης 20mM ιμιδαζολίου, Δείγμα 3 έως 10: Κλάσματα έκλουσης της His-3C πρωτεΐνης από 1 έως 8 με διάλυμα 300mM ιμιδαζολίου, Δείγμα 11 έως 12: Κλάσματα έκλουσης της His-3C πρωτεΐνης από 1 έως 2 με διάλυμα 500mM ιμιδαζολίου, Δείγμα 13: Πρωτεϊνικό διάλυμα έκλουσης με διάλυμα 1M ιμιδαζολίου.

4.2.3. Έλεγχος δραστηριότητας της His-3C πρωτεΐνης στην πέψη της χημεικής Trx-aroE3

Προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη αναλογία His-3C πρωτεΐνης:Trx-aroE (w/w) που απαιτείται για την πλήρη αποκοπή της ετικέτας Trx-6 His (18kDa) από την αροE3,

πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις πέψης σε διαφορετικές αναλογίες (w/w) His-3C πρωτεάσης:χμιαϊρικής Trx-αροΕ3 πρωτεΐνης, για 16-18h στους 4°C. Οι αναλογίες (w/w) His-3C πρωτεάσης:Trx-αροΕ3 που εξετάστηκαν ήταν οι εξής: 0:1, 1:120, 1:100, 1:80, 1:60, 1:40, 1:25, 1:20 και 1:10. Λήφθηκε δείγμα από κάθε ενζυμική αντίδραση και αναλύθηκε με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (15% w/v) (Εικόνα 4.4). Από την ανάλυση των ενζυμικών αντιδράσεων με υπόστρωμα την Trx-αροΕ3 (52kDa) προέκυψε ότι η His-3C πρωτεάση (24kDa) ήταν αρκετά δραστική ώστε να πέψει την Trx-αροΕ3 ακόμη και σε αναλογία 1:120 (w/w) 3C-His πρωτεάσης:Trx-αροΕ. Τελικά, επελέγει η αντίδραση πέψης της συνολικής ποσότητας της παραχθείσας Trx-αροΕ3 από την His-3C πρωτεάση να πραγματοποιείται σε αναλογία εύρους 1:120-1:80 (w/w) His-3C πρωτεάσης:Trx-αροΕ3.



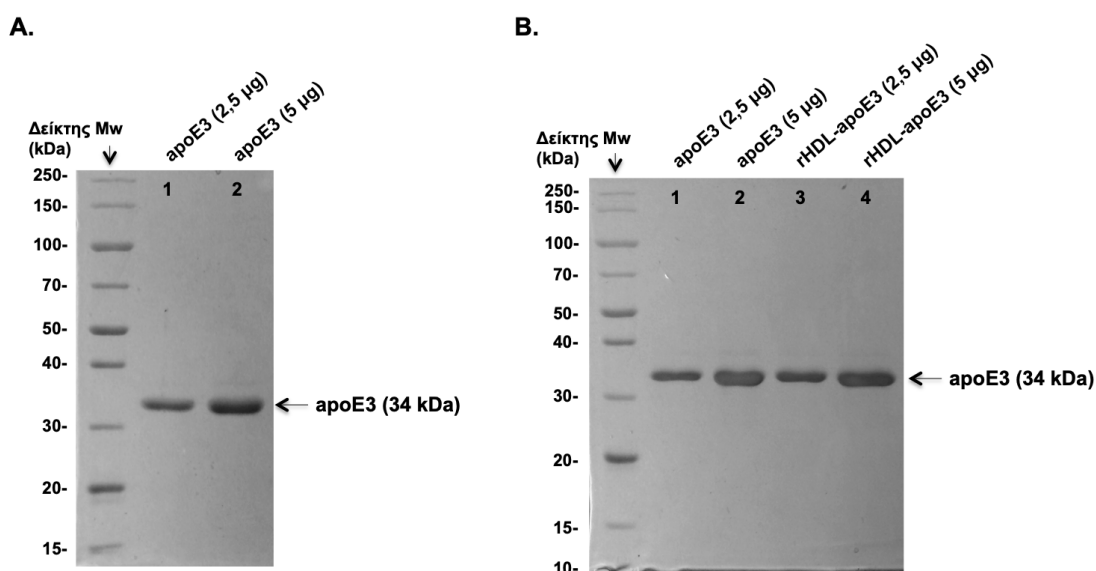
Εικόνα 4.4: Έλεγχος δραστικότητας της His-3C πρωτεάσης στην πέψη της χμιαϊρικής Trx-αροΕ3 για την πλήρη αποκοπή της ετικέτας Trx-6 His (18kDa) και την επακόλουθη παραγωγή της 34kDa αροΕ3. Ανάλυση δειγμάτων από τις ενζυμικές αντιδράσεις πέψης της χμιαϊρικής Trx-αροΕ3 από την His-3C πρωτεάση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (15% v/v) σε αναλογίες: 0:1, 1:120, 1:100, 1:80, 1:60, 1:40, 1:25, 1:20 και 1:10 (w/w) His-3C πρωτεάσης:Trx-αροΕ3.

4.3. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των δισκοειδών ανασυγκροτημένων HDL σωματιδίων που αποτελούνται από αροΕ3 και φωσφολιπίδια (rHDL-αροΕ3)

4.3.1. Έλεγχος της δομικής ακεραιότητας και καθαρότητας της ελεύθερης λιπιδίων αναδιπλωμένης αροΕ3 και της αροΕ3 των rHDL-αροΕ3 σωματιδίων

Μετά τον καθαρισμό της ανθρώπινης αροΕ3 (Ενότητα 4.1.3), η λυοφιλιωμένη πρωτεΐνη υφίσταται χημική αποδιάταξη παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης. Η επακόλουθη επαναδιάταξη της αροΕ3 μετά την απομάκρυνση του μετουσιωτικού παράγοντα επιτρέπει

την ανάκτηση της εγγενούς διαμόρφωσης της πρωτεΐνης στο χώρο και την απομάκρυνση τυχόν ασταθών συσσωματωμάτων μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης. Η αναδιπλωμένη apoE3 που ανέκτησε τη σωστή διαμόρφωση χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δισκοειδών ανασυγκροτημένων HDL σωματιδίων (rHDL-apoE3). Πριν την παρασκευή των rHDL-apoE3 σωματιδίων, δείγματα της αναδιπλωμένης apoE3 αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (12% v/v) προκειμένου να ελεγχθεί η δομική ακεραιότητα και η καθαρότητα της πρωτεΐνης (Εικόνα 4.5A). Στην Εικόνα 4.5A παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της αναδιπλωμένης apoE3 με βάση τα οποία επιβεβαιώθηκε η δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης από την παρουσία μίας μόνο ζώνης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (34kDa). Η καθαρότητα της αναδιπλωμένης apoE3 που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα για την παρασκευή των rHDL-apoE3 σωματιδίων ήταν τουλάχιστον 95%, όπως προσδιορίστηκε με πυκνομετρική σάρωση χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ (Εικόνα 4.5A).



Εικόνα 4.5: Έλεγχος της δομικής ακεραιότητας και της καθαρότητας της ελεύθερης λιπιδίων αναδιπλωμένης apoE3 (A-B) και της apoE3 στα rHDL-apoE3 σωματίδια (B). Ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (12% v/v) των δειγμάτων της ελεύθερης λιπιδίων αναδιπλωμένης apoE3 (A: Δείγματα: 1-2 και B: Δείγματα: 1-2) και της apoE3 των rHDL-apoE3 σωματιδίων (B: Δείγματα: 3-4).

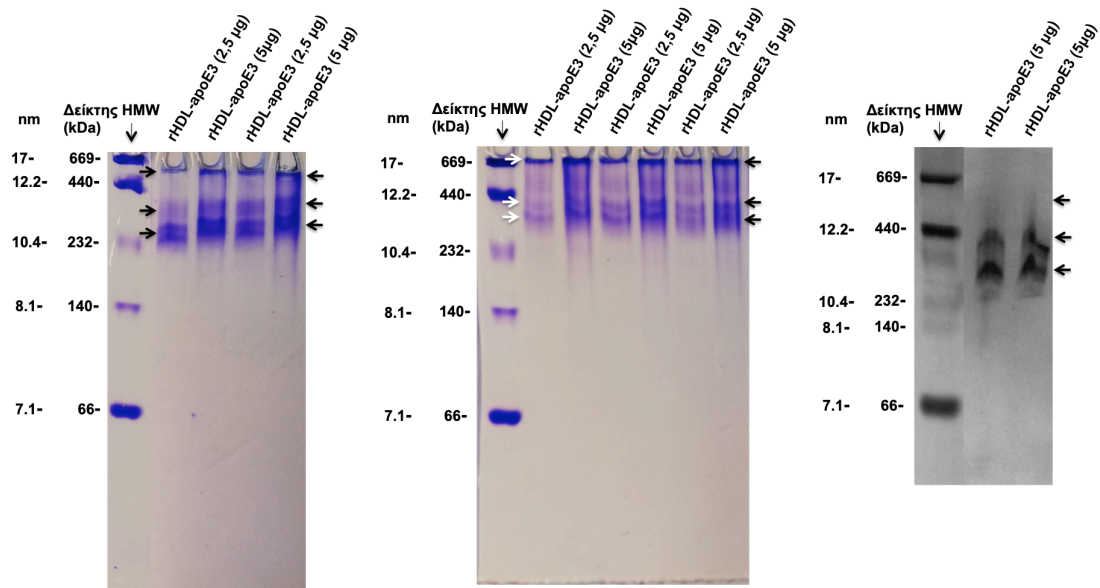
4.3.2. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος των rHDL-apoE3 σωματιδίων

Τα rHDL-apoE3 σωματίδια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας διατριβής παρασκευάστηκαν από φρέσκια καθαρή αναδιπλωμένη apoE3 και φωσφολιπίδια. Για την παρασκευή των rHDL-apoE3 σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η μοριακή αναλογία 100:1

φωσφολιπίδια:apoE3. Ακολούθησε ποσοτικός έλεγχος των rHDL-apoE3 σωματιδίων πριν τη χρήση τους. Ειδικότερα, τα rHDL-apoE3 σωματίδια σε κάθε πείραμα παρασκευής αξιολογήθηκαν ποσοτικά ως προς τη μοριακή αναλογία φωσφολιπίδια:apoE3 μέσω ποσοτικού προσδιορισμού της apoE3 και των φωσφολιπιδίων. Η μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) της μοριακής αναλογίας φωσφολιπίδια:apoE3 στα rHDL-apoE3 σωματίδια που υπολογίστηκε από όλα τα ανεξάρτητα πειράματα παρασκευής στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ήταν $98,78 \pm 13,32 : 1$ (κανονικοποιημένη ως προς την apoE3) ή $100 : 1,03 \pm 0,13$ (κανονικοποιημένη ως προς τα φωσφολιπίδια).

Τα rHDL-apoE3 σωματίδια ελέγχθηκαν, επίσης, ποιοτικά πριν τη χρήση τους. Ειδικότερα, αξιολογήθηκε ο επιτυχής σχηματισμός των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων rHDL-apoE3 μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v) (Εικόνα 4.6) ή σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% (v/v) (Εικόνα 4.7), υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες στους 4°C. Με τον τρόπο αυτό, οι υποπληθυσμοί των rHDL-apoE3 σωματιδίων αναλήθηκαν με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο, η οποία υπολογίστηκε από τους πρωτεϊνικούς δείκτες υψηλής μοριακής μάζας με γνωστά μοριακά βάρη και γνωστές υδροδυναμικές διαμέτρους που ηλεκτροφορήθηκαν παράλληλα.

Στην Εικόνα 4.6 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ανάλυσης διαφορετικών δειγμάτων των rHDL-apoE3 σωματιδίων (2,5 μ g και 5 μ g) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v), υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Εμφανίζονται τρεις διακριτοί υποπληθυσμοί rHDL-apoE3 σωματιδίων με διαφορετική υδροδυναμική διάμετρο και μοριακή μάζα. Ειδικότερα, διακρίνεται μία μεγάλη ευρεία ζώνη rHDL-apoE3 σωματιδίων με διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από 10.4nm, η οποία αντιστοιχεί στον υποπληθυσμό με μοριακό βάρος λίγο μεγαλύτερο από 232kDa. Οι δύο μικρότερες ζώνες αντιστοιχούν σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια με μεγαλύτερη διάμετρο. Τα rHDL-apoE3 σωματίδια με υδροδυναμική διάμετρο λίγο μικρότερη από 12.2nm αντιπροσωπεύουν έναν δεύτερο υποπληθυσμό με μοριακό βάρος λίγο μικρότερο από 440kDa. Ο τρίτος υποπληθυσμός με μοριακό βάρος περίπου 669kDa αντιστοιχεί σε rHDL-apoE3 σωματίδια με υδροδυναμική διάμετρο περίπου 17nm (Εικόνα 4.6). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια με διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από 10.4nm αντιπροσωπεύουν τον κύριο υποπληθυσμό των rHDL-apoE3 σωματιδίων, ενώ τα μεγαλύτερης διαμέτρου σωματίδια (λίγο μικρότερη από 12nm και περίπου 17nm) αντιπροσωπεύουν μικρότερους υποπληθυσμούς των rHDL-apoE3 σωματιδίων.

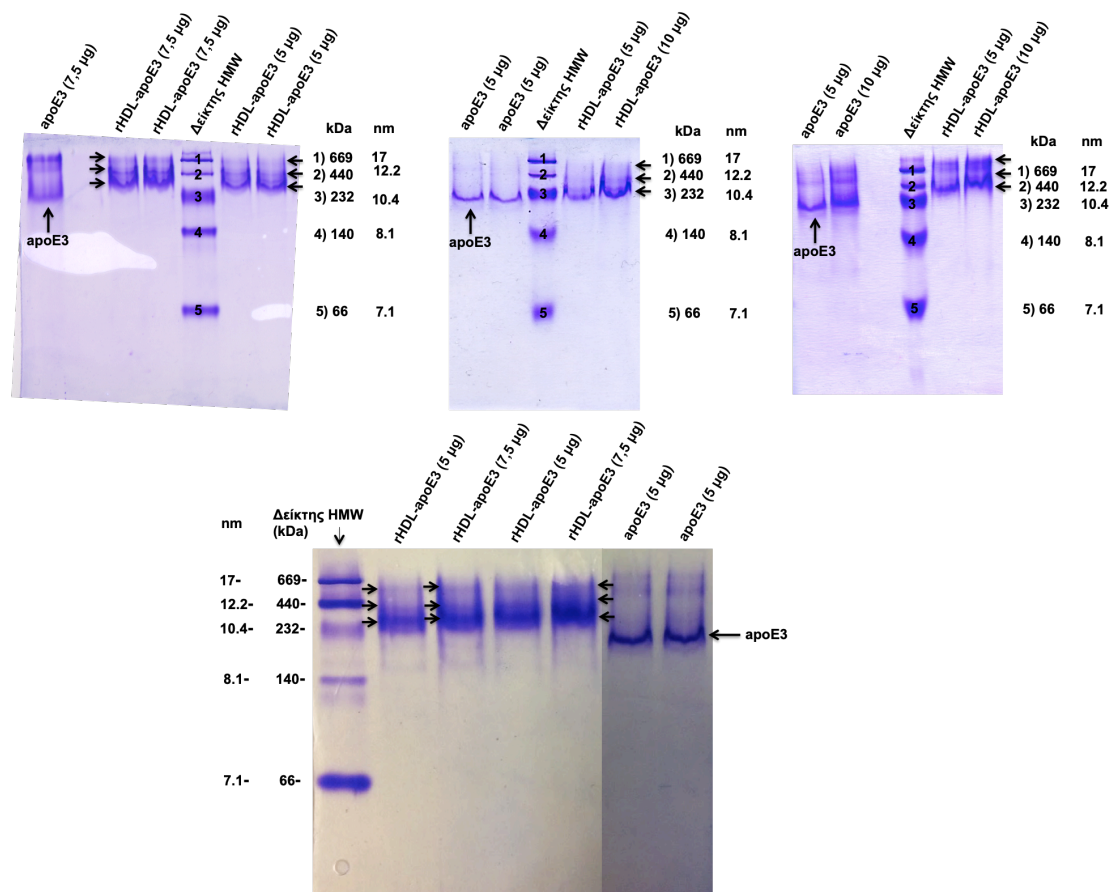


Εικόνα 4.6: Τα rHDL-apoE3 σωματίδια σχηματίζουν τρεις διακριτούς υποπληθυσμούς με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διαβαθμιζόμενης πυκνότητας 4-20% (v/v), υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, διαφορετικών δειγμάτων rHDL-apoE3 σωματιδίων με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο, η οποία υπολογίζεται από τους πρωτεϊνικούς δείκτες υψηλής μοριακής μάζας (HMW, high molecular weight) με γνωστά μοριακά βάρη και γνωστές υδροδυναμικές διαμέτρους (Strokes, nm). Τα βέλη δείχνουν την παρουσία μίας μεγάλης ευρείας ζώνης rHDL-apoE3 σωματιδίων με διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από 10.4nm (υποπληθυσμός με μοριακό βάρος λίγο μεγαλύτερο από 232kDa) και δύο μικρότερων ζωνών που αντιστοιχούν σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια με μεγαλύτερη διάμετρο: 1) Λίγο μικρότερη από 12.2nm (υποπληθυσμός με μοριακό βάρος λίγο μικρότερο από 440kDa) και 2) περίπου 17nm (υποπληθυσμός με μοριακό βάρος περίπου 669kDa).

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από την ανάλυση των υποπληθυσμών των rHDL-apoE3 σωματιδίων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% (v/v), υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 4.7). Στην Εικόνα 4.7 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής από διαφορετικά δείγματα rHDL-apoE3 σωματιδίων (5 μg, 7,5 μg και 10 μg). Διακρίνονται τρεις ζώνες που αντιπροσωπεύουν τους τρεις διακριτούς υποπληθυσμούς των rHDL-apoE3 σωματιδίων: 1) ο κύριος υποπληθυσμός ο οποίος αποτελείται από λιποπρωτεϊνικά σωματίδια με υδροδυναμική διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από 10.4nm (μοριακό βάρος λίγο μεγαλύτερο από 232kDa) και 2) οι δύο μικρότεροι υποπληθυσμοί που αντιστοιχούν σε σωματίδια μεγαλύτερης διαμέτρου, λίγο μικρότερη από 12.2nm (υποπληθυσμός με μοριακό βάρος λίγο μικρότερο από 440kDa) και περίπου

17nm (υποπληθυσμός με μοριακό βάρος περίπου 669kDa).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7, παράλληλα με τα διαφορετικά δείγματα των rHDL-αποΕ3 σωματιδίων ηλεκτροφορήθηκαν και διαφορετικά δείγματα ελεύθερης λιπιδίων αναδιπλωμένης αποΕ3 ίσης ποσότητας (5 μg, 7,5 μg και 10 μg), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των σωματιδίων. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε ο επιτυχής σχηματισμός των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, καθώς λόγω της σύνδεσης της αποΕ3 με τα λιποσώματα, τα rHDL-αποΕ3 σωματίδια έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την ελεύθερη λιπιδίων απολιποπρωτεΐνη. Επιπλέον, αξιολογήθηκε αν έχει δεσμευτεί όλη η αποΕ3 στα λιποσώματα ή αν τα rHDL-αποΕ3 σωματίδια περιέχουν ελεύθερη λιπιδίων αποΕ3 σε μικρό ποσοστό. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7, στα δείγματα των rHDL-αποΕ3 σωματιδίων απουσιάζει η χαμηλότερου μοριακού βάρους ζώνη που αντιστοιχεί στην ελεύθερη λιπιδίων αποΕ3. Αυτό σημαίνει ότι έχει δεσμευτεί όλη η αποΕ3 στα λιποσώματα, και ως εκ τούτου τα rHDL-αποΕ3 σωματίδια δεν περιέχουν την ελεύθερη λιπιδίων πρωτεΐνη.



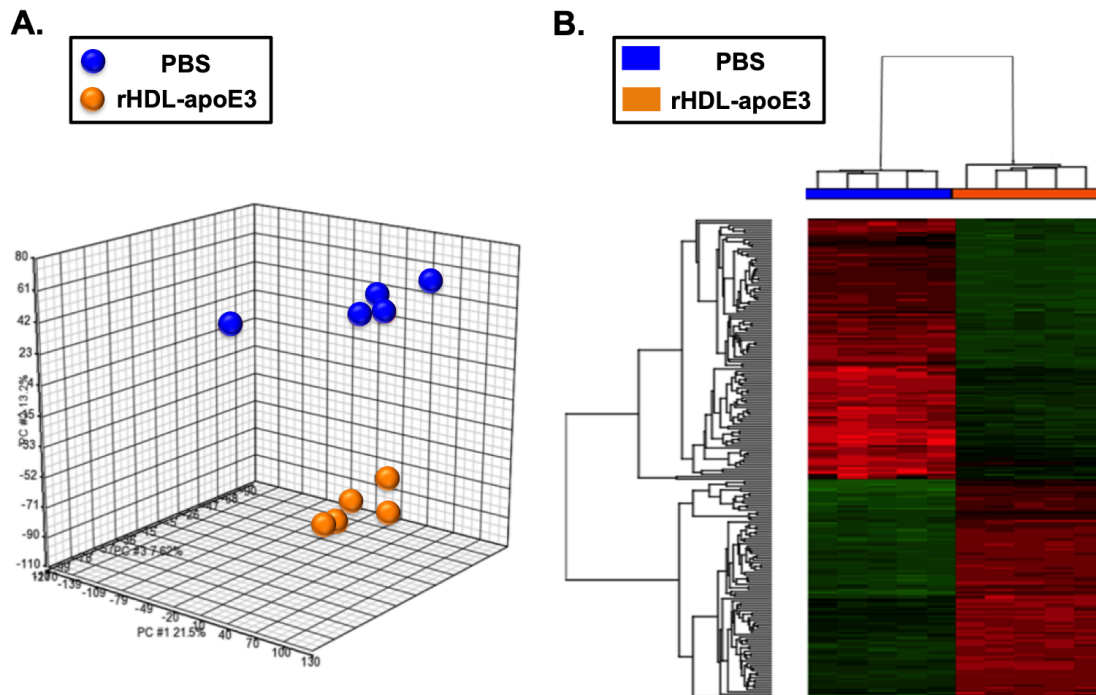
Εικόνα 4.7: Ποιοτικός έλεγχος του επιτυχούς σχηματισμού των rHDL-αποΕ3 σωματιδίων και της παρουσίας της ελεύθερης λιπιδίων αποΕ3 σε αυτά. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% (v/v), υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, των υποπληθυσμών δειγμάτων rHDL-αποΕ3 σωματιδίων παράλληλα με δείγματα ελεύθερης λιπιδίων

αναδιπλωμένης apoE3. Τα βέλη δείχνουν την παρουσία τριών διακριτών υποπληθυσμών των rHDL-apoE3 σωματιδίων με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο, η οποία υπολογίζεται από τους πρωτεϊνικούς δείκτες υψηλής μοριακής μάζας με γνωστά μοριακά βάρη και γνωστές υδροδυναμικές διαμέτρους (Stokes, nm). Ο κύριος υποπληθυσμός αποτελείται από rHDL-apoE3 σωματίδια με διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από 10.4nm (υποπληθυσμός με μοριακό βάρος λίγο μεγαλύτερο από 232kDa), ενώ τα μεγαλύτερης διαμέτρου λιποπρωτεϊνικά σωματίδια (λίγο μικρότερη από 12nm και περίπου 17nm) αντιπροσωπεύουν δύο μικρότερους υποπληθυσμούς των rHDL-apoE3 σωματιδίων με μοριακό βάρος λίγο μικρότερο από 440kDa και περίπου 669kDa, αντίστοιχα).

Τα rHDL-apoE3 σωματίδια ελέγχθηκαν, επίσης, ποιοτικά ως προς τη δομική ακεραιότητα και καθαρότητα της περιεχόμενης apoE3. Ειδικότερα, δείγματα rHDL-apoE3 σωματιδίων αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (12% (v/v)) παράλληλα με δείγματα της ελεύθερης λιπιδίων αναδιπλωμένης apoE3 ίσης ποσότητας, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους (Εικόνα 4.5B). Στην Εικόνα 4.5B παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των rHDL-apoE3 σωματιδίων (Δείγματα 3-4) και της ελεύθερης λιπιδίων apoE3 (Δείγματα 1-2). Η δομική ακεραιότητα της περιεχόμενης apoE3 στα rHDL-apoE3 σωματίδια (Εικόνα 4.5B, Δείγματα 3-4) επιβεβαιώθηκε καθώς στα δείγματα αυτά εμφανίστηκε μία μόνο ζώνη στα 34kDa, η οποία αντιστοιχεί στην ελεύθερη λιπιδίων apoE3. Η καθαρότητα της apoE3 των rHDL-apoE3 σωματιδίων (Εικόνα 4.5B, Δείγματα 3-4) ήταν η ίδια με αυτή των δειγμάτων της ελεύθερης λιπιδίων apoE3, δηλαδή τουλάχιστον 95% (Εικόνα 4.5B, Δείγματα 1-2).

4.4.Η rHDL-apoE3 επάγει διακριτά προφίλ ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα

Για την αμερόληπτη και σφαιρική αξιολόγηση των γονιδίων, μοριακών μηχανισμών και σηματοδοτικών μονοπατιών που επλέκονται στη δράση της rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση (12h) με rHDL-apoE3 (250 $\mu\text{g/ml}$) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) με την τεχνική των μικροσυστοιχιών (Ενότητα 3.18). Εφαρμόστηκε η ανάλυση RMA (Robust Multi-chip Analysis) για την κανονικοποίηση των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών (Ενότητα 3.19.1) και ακολούθησαν ειδικές συσχετίσεις ομαδοποίησης και ιεράρχησης των προφίλ γονιδιακής έκφρασης κάθε δείγματος [466]. Μεταξύ αυτών πραγματοποιήθηκε η ανάλυση PCA (Principal Component Analysis) [468] χρησιμοποιώντας το σύνολο των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών (Ενότητα 3.19.1) η οποία έδειξε σαφή διάκριση στην ομαδοποίηση των δειγμάτων που εκτέθηκαν στην rHDL-apoE3 και των δειγμάτων PBS, υποδηλώνοντας ότι η rHDL-apoE3 επάγει διακριτές αλλαγές σε επίπεδο ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα (Εικόνα 4.8A). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCA, η Ιεραρχική Ομαδοποίηση των προφίλ γονιδιακής έκφρασης (Hierarchical Clustering) (Ενότητα 3.19.1) [469] των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων ($FC \geq \pm 2,00$ και $FDR \leq 0,05$) ανάμεσα στα δείγματα rHDL-apoE3 και PBS (Ενότητα 4.5.1) ανέδειξε δύο μεγάλους διακριτούς “κλάδους” γονιδιακής έκφρασης που αντιστοιχούν στις δύο αυτές ομάδες δειγμάτων. Οι κλάδοι αυτοί αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 σε σχέση με την έκθεση σε PBS, υποδηλώνοντας την ύπαρξη εμφανώς διαφορετικών προφίλ γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο αυτών ομάδων δειγμάτων (Εικόνα 4.1B). Συμπερασματικά, τα προαναφερθέντα ευρήματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης υποδεικνύουν ότι η rHDL-apoE3 επάγει σημαντικές διαφορές σε επίπεδο ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα.



Εικόνα 4.8: Η rHDL-apoE3 επάγει διακριτές υπογραφές ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα. Α) Η ανάλυση PCA ανέδειξε μία διακριτή ομαδοποίηση των προφίλ ολικής γονιδιακής έκφρασης στα δείγματα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς PBS. Κάθε πορτοκαλί ή μπλέ σφαίρα αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό δείγμα από τα 5 δείγματα των HAEC κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με rHDL-apoE3 ή PBS, αντίστοιχα. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών. Β) Η Ιεραρχική Ομαδοποίηση απεικονίζει δύο μεγάλους διακριτούς κλάδους που αντιπροσωπεύουν τα εμφανώς διαφορετικά προφίλ ολικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων, τα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 και τα κύτταρα αναφοράς PBS. Οι κάθετοι και οριζόντιοι άξονες αντιπροσωπεύουν μεμονωμένα δείγματα και γονίδια, αντίστοιχα. Στην ανάλυση αυτή συμπεριελήφθηκαν μόνο τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια ($F \geq \pm 2,00$ και $FDR \leq 0,05$) που προέκυψαν από τις μικροσυστοιχίες. Η χρωματική διαβάθμιση από έντονο πράσινο σε έντονο κόκκινο αντιστοιχεί σε διαβάθμιση της γονιδιακής έκφρασης από υψηλά σε χαμηλά επίπεδα.

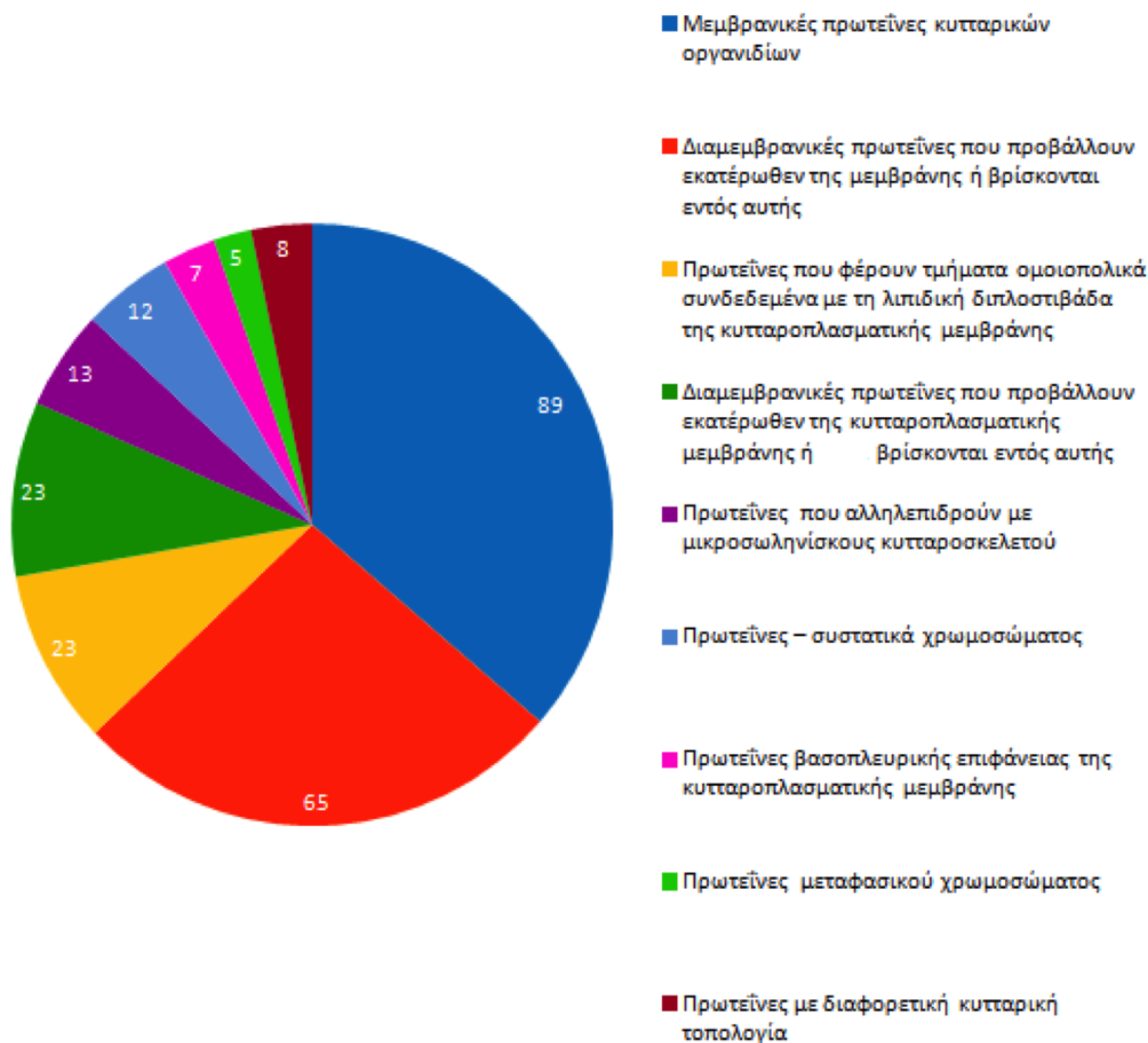
4.5. Η rHDL-apoE3 επηρεάζει γονίδια και βιολογικές λειτουργίες των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου και την αθηροσκλήρωση

4.5.1. Στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα μετάγραφα των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα γονίδια και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη δράση της rHDL-apoE3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ολικής γονιδιακής έκφρασης των HAEC κυττάρων μετά από επώαση (12h) με rHDL-apoE3 ή PBS (Ενότητα 3.18). Οι στατιστικώς σημαντικές αλλαγές γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των ομάδων δειγμάτων εντοπίστηκαν μέσω στατιστικής ανάλυσης (pairwise Welch t-Τεστ, t-statistic, P-value και FDR q-value), εφαρμόζοντας αυστηρά κριτήρια ανάλυσης: $FC \geq \pm 2,00$ και $FDR \leq 0,05$. Ως θετικός ή αρνητικός λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης (FC, Fold Change) ορίζεται ο λόγος της μέσης έκφρασης ενός γονιδίου μετά από έκθεση των κυττάρων στην rHDL-apoE3 προς την έκφρασή του στα κύτταρα αναφοράς PBS ($n = 5$ βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία). Το FDR είναι ο τρόπος υπολογισμού της πιθανότητας οι συγκεκριμένες μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης να είναι τυχαίο προϊόν και να μην αποτελούν συστηματικό βιολογικό εύρημα (Ενότητα 3.19.1). Από τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές αλλαγές έκφρασης σε 198 γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS (Πίνακας 1 – Παράρτημα). Τα 89/198 γονίδια υπερεκφράζονταν, δηλαδή παρουσίασαν αυξημένη έκφραση μετά από επώαση των κυττάρων με την rHDL-apoE3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS. Σε κάθε ένα από τα γονίδια αυτά αντιστοιχεί ένας θετικός λόγος έκφρασης που κυμαίνεται από + 2,000 μέχρι + 7,739. Αντίθετα, 109/198 γονίδια υποεκφράζονταν, δηλαδή η έκφρασή τους μειώθηκε μετά από έκθεση των κυττάρων στην rHDL-apoE3 συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς PBS. Σε κάθε ένα από τα γονίδια αυτά αντιστοιχεί ένας αρνητικός λόγος έκφρασης που κυμαίνεται από - 2,000 έως - 7,861. Αναλυτικότερα, τα 5 γονίδια των HAEC κυττάρων που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση μετά από έκθεση στην HDL-apoE3 ήταν τα εξής: 1) CYP1A1 (FC = + 7,739), 2) ANGPTL4 (FC = + 5,281), 3) ADAMTS4 (FC = + 5,099), 4) PRDM1 (FC = + 4,841) και 5) LIPG (FC = + 4,590). Αντίστοιχα, η rHDL-apoE3 προκάλεσε τη μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση των εξής 5 γονιδίων στα HAEC κύτταρα: 1) PTX3 (FC = - 7,861), 2) AK5 (FC = - 6,771), 3) MGARP (FC = - 5,324), 4) HTR1B (FC = - 5,091) και 5) CXCL1 (FC = - 4,860).

4.5.2. Gene Ontology (GO) ανάλυση με βάση την κυτταρική τοπολογία των πρωτεϊνικών προϊόντων των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3

Τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα μετάγραφα των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την τοπολογία των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών στο κύτταρο (Cellular Component, CC) εφαρμόζοντας την ομαδοποίηση Gene Ontology (GO) με τη χρήση του λογισμικού GeneCodis (Gene annotations Co-occurrence discovery, Πανεπιστήμιο της Μασαχουσέτης) (Εικόνα 4.9) (Ενότητα 3.19.2.1). Κάθε κατηγορία γονιδίων που προκύπτει από τη GO ομαδοποίηση χαρακτηρίζεται από την τιμή *P*-value (βαθμός σημαντικότητας), η οποία υπολογίζεται από τα στατιστικά τεστ Υπεργεωμετρική Κατανομή και το Chi-Square Test. Η τιμή αυτή εκφράζει την πιθανότητα η κατηγοριοποίηση ενός γονιδίου σε μία συγκεκριμένη ομάδα να έχει προκύψει τυχαία, δηλαδή να μην είναι συστηματικό βιολογικό εύρημα, και ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται το $P \leq 0,05$ (Ενότητα 3.19.2.1). Η GO ομαδοποίηση των γονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά κοινώς αποδεκτά επίπεδα αυξανόμενης «λεπτομέρειας» που έχουν αριθμηθεί από 1 έως 11 [473]. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, η GO ομαδοποίηση των αλλαγμένων γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο 7. Στην Εικόνα 4.9 παρουσιάζονται οι στατιστικώς σημαντικές GO κατηγορίες στις οποίες ομαδοποιούνται τα περισσότερα αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 με βάση την κυτταρική τοπολογία των πρωτεϊνικών προϊόντων τους. Οι περισσότερες αλλαγές παρατηρήθηκαν σε γονίδια που κωδικοποιούν για μεμβρανικές πρωτεΐνες των ενδοκυτταρικών οργανιδίων (89 γονίδια), καθώς και σε γονίδια που κωδικοποιούν για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν τη διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων της μεμβράνης τουλάχιστον μία φορά ή βρίσκονται εντός αυτής (65 γονίδια).



Εικόνα 4.9: Ομαδοποίηση GO (επίπεδο 7) με βάση την κυτταρική τοπολογία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αpoE3. Παρουσιάζονται οι μεγαλύτερες στατιστικώς σημαντικές κατηγορίες με $P \leq 0,05$. Για κάθε κατηγορία γονιδίων παρουσιάζεται ο αντίστοιχος αριθμός γονιδίων.

4.5.3. Βιολογικές και μοριακές λειτουργίες των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αpoE3 με βάση την “Κεντρική Ανάλυση” IPA

Ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αpoE3 με τη χρήση του λογισμικού Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ενότητα 3.19.2.2.1). Τα ευρήματα της IPA ανάλυσης που παρουσιάζονται βασίζονται σε πειραματικά αποτελέσματα επιστημονικών δημοσιεύσεων, τα οποία οργανώνονται στη βάση δεδομένων του Ingenuity (Ingenuity knowledge base), και αφορούν, μεταξύ άλλων, τις βιολογικές και μοριακές λειτουργίες των αλλαγμένων γονιδίων («Biological and Molecular

Function Analysis»), τα δίκτυα («Network Analysis») στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια, καθώς και τους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές που ενδέχεται να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων αυτών («Upstream Regulator Analysis»).

Με τη χρήση της «Κεντρικής Ανάλυσης» («Core Analysis») του λογισμικού IPA, χρησιμοποιώντας ειδικά επιλεγμένες συνθήκες ανάλυσης (settings), κατηγοριοποιήθηκαν τα αλλαγμένα γονίδια με βάση τις βιολογικές και μοριακές τους λειτουργίες («Ανάλυση Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών», «Biological and Molecular Function Analysis») (Ενότητα 3.19.2.2.2). Κάθε λειτουργική κατηγορία της IPA ανάλυσης συνοδεύεται από έναν αριθμό γονιδίων που κατηγοριοποιούνται σε αυτήν και χαρακτηρίζεται από την τιμή *P*-value, η οποία υπολογίζεται από το right-tailed Fisher's Exact Test. Στο συγκεκριμένο τεστ αξιολογείται σε ποιες λειτουργικές κατηγορίες κατηγοριοποιούνται περισσότερα γονίδια από αυτά που αναμένονται να έχουν προκύψει τυχαία.

Με βάση την «Ανάλυση Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών» του IPA, χρησιμοποιώντας επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $P \leq 0,05$, προέκυψαν 23 στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένες βιολογικές και μοριακές λειτουργίες των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS (Πίνακας 2 – Παράρτημα). Από τις λειτουργίες αυτές, οι τρεις στις οποίες κατηγοριοποιήθηκαν τα περισσότερα αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από επώαση με την rHDL-αροΕ3 ήταν οι εξής: «Κυτταρική Κίνηση» (64 γονίδια, P -value = $5,69 \times 10^{-15}$ - $6,11 \times 10^{-3}$), «Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός» (75 γονίδια, P -value = $2,98 \times 10^{-11}$ - $6,61 \times 10^{-3}$) και «Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση» (63 γονίδια, P -value = $2,76 \times 10^{-10}$ - $5,91 \times 10^{-3}$) (Πίνακας 2 – Παράρτημα) (Πίνακας 4.1) (Εικόνα 4.10). Οι εν λόγω λειτουργίες που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία του ενδοθηλίου. Συγκεκριμένα, οι λειτουργίες αυτές είναι σημαντικές για τη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας του αρτηριακού τοιχώματος, την επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό [214] [220]. Η διατάραξη της ενδοθηλιακής ακεραιότητας (τραυματισμός του ενδοθηλίου) του αρτηριακού τοιχώματος αποτελεί το κρίσιμο αναγκαστικό βήμα της αθηρογένεσης καθώς προκαλεί τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [6] [22] [24].

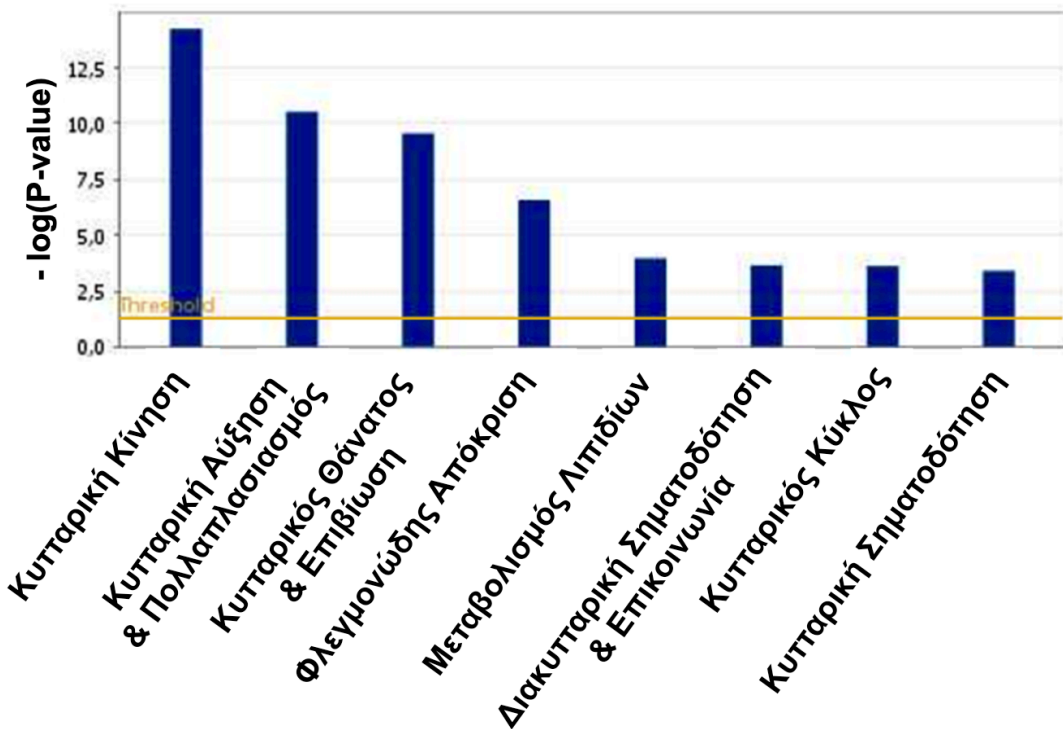
Άλλες στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένες βιολογικές ή μοριακές λειτουργίες που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση και ρυθμίζουν την εξέλιξή της ήταν οι εξής: «Φλεγμονώδης Απόκριση» (44 γονίδια, P -value = $2,61 \times 10^{-7}$ - $6,61 \times 10^{-3}$), «Μεταβολισμός Λιπιδίων» (34 γονίδια, P -value = $1,07 \times 10^{-4}$ - $6,11 \times 10^{-3}$), «Διακυτταρική Σηματοδότηση και

Επικοινωνία” (29 γονίδια, P -value = $2,21 \times 10^{-4}$ - $5,20 \times 10^{-3}$), “Κυτταρικός Κύκλος” (11 γονίδια, P -value = $2,38 \times 10^{-4}$ - $6,61 \times 10^{-3}$) και “Κυτταρική Σηματοδότηση” (20 γονίδια, P -value = $3,91 \times 10^{-4}$ - $6,24 \times 10^{-3}$) (Πίνακας 2 – Παράρτημα) (Πίνακας 4.1) (Εικόνα 4.10). Ειδικότερα, η συσσώρευση λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα επάγει τη φλεγμονώδη απόκριση μέσω της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων του έσω χιτώνα και της επακόλουθης χημειοταξίας των φλεγμονωδών κυττάρων της κυκλοφορίας, όπως των μονοκυττάρων. Η χημειοταξία των κυττάρων αυτών διεξάγεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μόρια προσκόλλησης στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων [14] [24]. Επιπροσθέτως, η συσσώρευση λιπιδίων στα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος οδηγεί στη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία μέσω έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών επάγουν τη χημειοταξία επιπλέον μονοκυττάρων και T λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο του έσω χιτώνα [14]. Οι μηχανισμοί αυτοί οδηγούν στη μετατροπή ενός φυσιολογικού αγγείου σε αγγείο με αθηρωματική πλάκα και επάλληλη θρόμβωση (Ενότητες 1.1.2 και 1.1.3.2) [24] [30].

Πίνακας 4.1: Επιλεγμένες στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένες ($P \leq 0,05$) βιολογικές και μοριακές λειτουργίες που εντοπίζονται μεταξύ των HAEC κυττάρων που εκτέθηκαν στην rHDL-αποE3 και τα κύτταρα αναφοράς PBS οι οποίες σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου, την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου (επανεπενδοθηλιοποίηση) και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Για κάθε μία από τις οχτώ αυτές λειτουργίες παρουσιάζονται τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια που κατηγοριοποιούνται σε αυτήν. Οι εν λόγω λειτουργίες προέκυψαν από την «Ανάλυση Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών» του λογισμικού IPA και κατατάσσονται με βάση την τιμή P -value. Το σύνολο των 23 στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων βιολογικών και μοριακών λειτουργιών των HAEC κυττάρων μετά από επώαση με την rHDL-αποE3 παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 του Παραρτήματος.

| Επιλεγμένες Βιολογικές και Μοριακές Λειτουργίες | | |
|---|--|---|
| Λειτουργία | P -value | Στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια |
| Κυτταρική Κίνηση | $5,69 \times 10^{-15}$ - $6,11 \times 10^{-3}$ | KIF23, SOCS3, DIAPH3, HMMR, UNC5B, CXCL1, ETV1, NEXN, PBK, FHL2, ST8SIA4, TRAF3IP2, PIK3CG, SULT1E1, CD274, PRDM1, LYVE1, SCN5A, PTX3, IL8, HLX, FST, JAG2, COL4A1, SNAI1, AQP1, TFPI2, KLHL13, GCNT1, ABI3, PDGFD, CLDN11, NTN4, IL1RL1, NRG1, MAP3K5, ITGB8, TGM2, ID1, EFNB2, ANGPTL4, VIPR1, PPAP2B, TOP2A, TGFB2, FABP4, STAT1, CXCL11, PTGIR, UCP2, EDNRB, FLT1, EGR1, CDK1, CHST1, WARS, VAV3, ANXA3, DKK1, PTGS2, NEDD9, CXADR, DLL4, A2M |
| Αριθμός γονιδίων: 64 | | |

| | | |
|--|--|---|
| Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός Αριθμός γονιδίων: 75 | $2,98 \times 10^{-11}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | KIF23, SOCS3, INSIG1, NCAPG, HMMR, UNC5B, CXCL1, ETV1, MELK, MKI67, HES1, PBK, ST8SIA4, FHL2, ITGA11, PIK3CG, NUPR1, CHST11, SULT1E1, PRDM1, CD274, HEY2, SCN5A, PTX3, IL8, HLX, JAG2, COL4A1, FST, ADAMTS1, MT1X, AQP1, TFPI2, RASD1, RASGRF2, ANKRD1, GCNT1, PNP, LFNNG, PDGFD, KIF11, MT1E, PMEPA1, LAPTM5, NTN4, IL1RL1, NRG1, ITGB8, TGM2, ID1, EFN2, ANGPTL4, VIPR1, RARB, TGFB2, STAT1, CYP1A1, PTGIR, EDNRB, FLT1, EGR1, CDK1, TNFSF18, WARS, TNS3, KIF15, VAV3, NR4A1, MEF2C, DKK1, PTGS2, DLL4, A2M, NEDD9, CXADR |
| Κυτταρικός θάνατος και Επιβίωση Αριθμός γονιδίων: 63 | $2,76 \times 10^{-10}$ - $5,91 \times 10^{-3}$ | SOCS3, HMMR, UNC5B, CXCL1, MELK, HES1, PBK, ST8SIA4, TRAF3IP, FHL2, GPR37, PIK3CG, NUPR1, CHST11, PRDM1, CD274, PTGIS, IL8, COL4A1, JAG2, FST, MT1X, SNAI1, AQP1, RASD1, ANKRD1, GCNT1, PNP, MT1E, PMEPA, MME, NTN4, NRG1, MAP3K5, RAPGEF4, NUF2, TGM2, ID1, EFN2, ANGPTL4, RGS5, VIPR1, RARB, PRKAA2, TGFB2, TOP2A, STAT1, CXCL11, UCP2, EDNRB, EGR1, FLT1, CDK1, TNFSF18, AK5, VAV3, NR4A1, MEF2C, DKK1, PTGS2, DLL4, NEDD9, CXADR |
| Φλεγμονώδης Απόκριση Αριθμός γονιδίων: 44 | $2,61 \times 10^{-7}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | MME, SOCS3, LAPTM5, IL1RL1, UNC5B, NRG1, CXCL1, MAP3K5, PBK, TGM2, EFN2, FHL2, TRAF3IP2, VIPR1, PIK3CG, NUPR1, TOP2A, TGFB2, FABP4, PRDM1, CD274, STAT1, ACE, SCN5A, CXCL11, PTX3, IL8, UCP2, PTGIR, COL4A1, EDNRB, FLT1, EGR1, RASGRP3, GCNT1, VAV3, ANXA3, PNP, MEF2C, PTGS2, CXADR, NEDD9, DLL4, MT1E |
| Μεταβολισμός Λιπιδίων Αριθμός γονιδίων: 34 | $1,07 \times 10^{-4}$ - $6,11 \times 10^{-3}$ | SOCS3, SULT1C4, INSIG1, NRG1, UNC5B, CXCL1, ITGB8, ANGPTL4, ST8SIA4, VIPR1, PIK3CG, PPAP2B, PRKAA2, FABP4, SULT1E1, LIPG, ACE, PTX3, PTGIS, IL8, CYP1A1, PTGIR, UCP2, FST, PNPLA3, RSC1A1, EGR1, FLT1, HSD17B7, F2RL3, VAV3, NR4A1, PTGS2, MT1E |
| Διακυτταρική Σηματοδότηση και Επικοινωνία Αριθμός γονιδίων: 29 | $2,21 \times 10^{-4}$ - $5,20 \times 10^{-3}$ | MME, IL1RL1, NRG1, CXCL1, TGM2, EFN2, TRAF3IP2, FHL2, VIPR1, PIK3CG, TGFB2, LIPG, STAT1, ACE, CXCL11, SCN5A, PTX3, IL8, PTGIR, UCP2, FLT1, TNFSF18, F2RL3, CHST1, GCNT1, NR4A1, LFNNG, A2M, CXADR |
| Κυτταρικός Κύκλος Αριθμός γονιδίων: n = 11 | $2,38 \times 10^{-4}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | KIF23, KLHL13, ASPM, VAV3, DIAPH3, EGR1, NRG1, TOP2A, HES1, NUF2, CDK1 |
| Κυτταρική Σηματοδότηση Αριθμός γονιδίων: n = 20 | $3,91 \times 10^{-4}$ - $6,24 \times 10^{-3}$ | PTX3, SOCS3, IL8, UCP2, EDNRB, FLT1, NRG1, MAP3K5, TGM2, ID1, F2RL3, RASGRP3, PIK3CG, VAV3, MEF2C, PTGS2, STAT1, TMOD1, A2M, CXCL11 |



Εικόνα 4.10: Η rHDL-αροΕ3 επηρεάζει βιολογικές και μοριακές λειτουργίες των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με την ακεραιότητα του ενδοθηλίου και την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου και ρυθμίζουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Ραβδόγραμμα των οχτώ επιλεγμένων στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων βιολογικών και μοριακών λειτουργικών κατηγοριών γονιδίων που εντοπίζονται μεταξύ των HAEC κυττάρων που επώαστηκαν με την rHDL-αροΕ3 και τα κύτταρα αναφοράς PBS οι οποίες σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία του ενδοθηλίου, την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος (επανεπενδοθηλιοποίηση) και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Οι κατηγορίες αυτές προέκυψαν από την «Ανάλυση Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών» του λογισμικού IPA και κατατάσσονται με βάση την τιμή $-\log(P\text{-value})$ χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test και $P\text{-value} \leq 0,05$. Η μπλε μπάρα αντιστοιχεί στην τιμή $-\log(P\text{-value})$ της εκάστοτε λειτουργικής κατηγορίας και η πορτοκαλί γραμμή αντιπροσωπεύει το όριο (threshold) πάνω από το οποίο είναι στατιστικώς σημαντική η κατηγορία αυτή.

4.5.4. Ανάλυση δικτύων των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 με βάση την “Κεντρική Ανάλυση” IPA

Η «Ανάλυση Δικτύων» («Network Analysis») της “Κεντρικής Ανάλυσης” IPA (Ενότητα 3.19.2.2.3) εντοπίζει δίκτυα στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3. Για κάθε ένα δίκτυο καταγράφονται: 1) ο αριθμός των αλλαγμένων

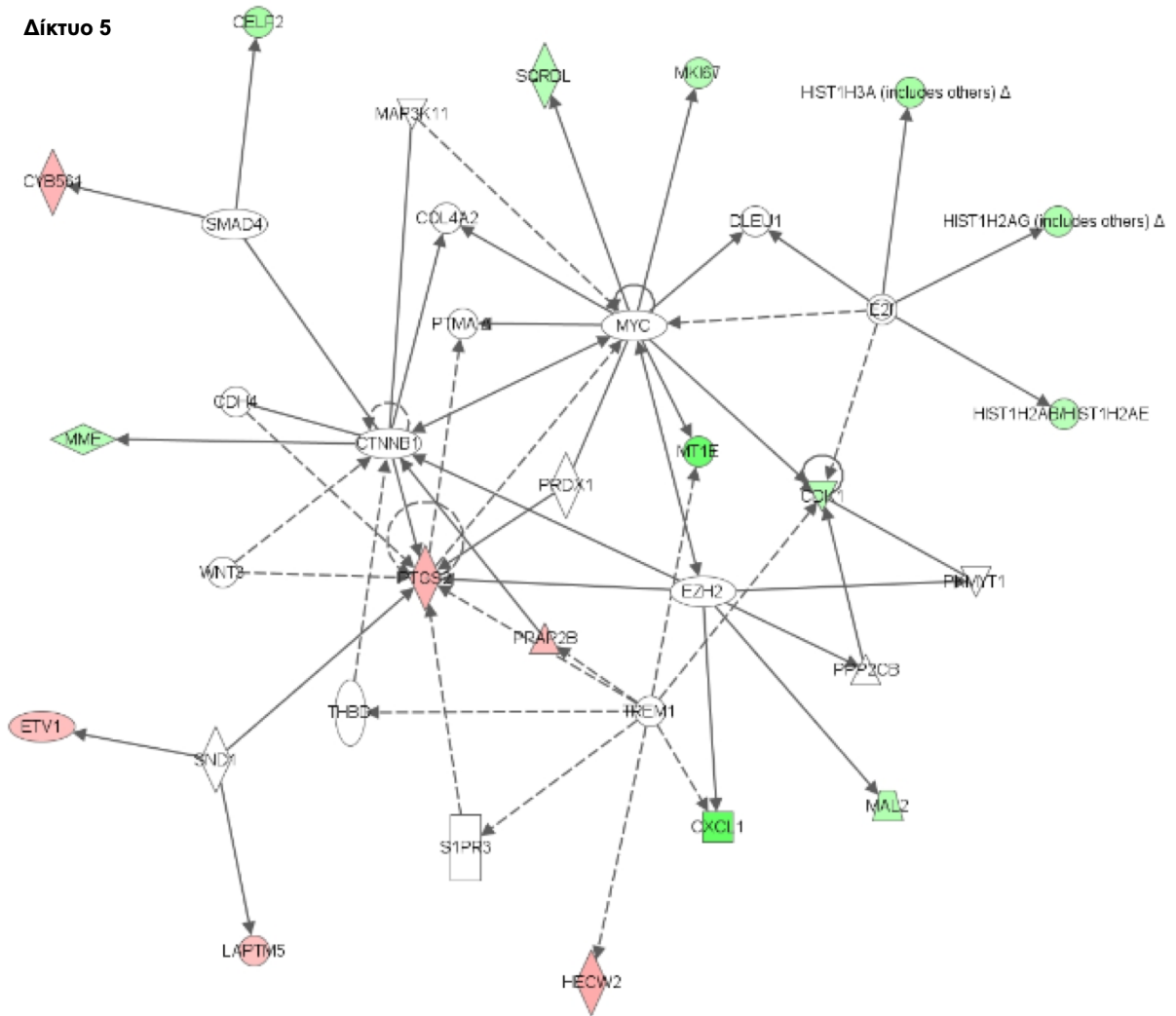
γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν το δίκτυο, 2) τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που περιέχονται στο δίκτυο, 3) τα γονίδια που δεν αλλάζουν έκφραση από την έκθεση των κυττάρων στην rHDL-αροΕ3 και κωδικοποιούν για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του δικτύου με τις οποίες σχετίζονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα αλλαγμένα γονίδια και, τέλος, 4) οι στατιστικώς σημαντικότερες βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών του δικτύου. Κάθε δίκτυο χαρακτηρίζεται από μία τιμή Σκορ. Η τιμή Σκορ υπολογίζεται από το right-tailed Fisher's Exact Test και δεν αποτελεί ένδειξη της βιολογικής σημασίας ενός δικτύου, αλλά εκφράζει τη μαθηματική σχέση μεταξύ ενός δικτύου και των "Network Eligible" μορίων της λίστας επιλογής του χρήστη. Με τον όρο "Network Eligible" μόρια ορίζονται τα μόρια εκείνα που πληρούν τα εξής κριτήρια: 1) θεωρούνται ως ιδιαίτερου ενδιαφέροντος μετά από σύγκριση των λόγων έκφρασης των μορίων αυτών με τους αντίστοιχους λόγους των άλλων μορίων της λίστας και 2) αλληλεπιδρούν με "Ingenuity Knowledge Base" μόρια της βάσης δεδομένων του Ingenuity. Η τιμή Σκορ προκύπτει λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των "Network Eligible" μορίων που συμμετέχουν στο δίκτυο και το μέγεθός του, καθώς και το συνολικό αριθμό των "Network Eligible" μορίων που αναλύονται, αλλά και το σύνολο των μορίων στη βάση δεδομένων του Ingenuity τα οποία θα μπορούσαν, ενδεχομένως, να συμπεριληφθούν στο δίκτυο.

Από την ανάλυση δικτύων προέκυψε μια σειρά από 16 διαφορετικά δίκτυα (Πίνακας 3 – Παράρτημα), τα οποία επιτρέπουν τη βαθύτερη κατανόηση του βιολογικού ρόλου των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων μετά από επώαση των HAEC κυττάρων με την rHDL-αροΕ3. Η μελέτη των δικτύων αυτών επιτρέπει την κατανόηση των συσχετίσεων (άμεσες/έμμεσες αλληλεπιδράσεις) ανάμεσα στα διαφορετικά στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια, και κατά συνέπεια, μεταξύ των μοριακών μηχανισμών των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την έκθεση στην rHDL-αροΕ3. Τα δίκτυα που προέκυψαν κατατάχθηκαν σε αύξουσα σειρά με βάση την τιμή Σκορ και τον αριθμό των αλλαγμένων γονιδίων που τα χαρακτηρίζουν. Στην Εικόνα 4.11 απεικονίζεται ένα χαρακτηριστικό δίκτυο (5^ο δίκτυο) των HAEC κυττάρων που επηρεάζεται από την έκθεση στην rHDL-αροΕ3 το οποίο περιέχει πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από 17 αλλαγμένα γονίδια και φέρει υψηλή τιμή Σκορ. Οι δύο από τις τρεις πιο στατιστικώς σημαντικές βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών του δικτύου είναι "η Κυτταρική Αύξηση και ο Πολλαπλασιασμός" και "ο Κυτταρικός Θάνατος και η Επιβίωση" (Πίνακας 3 – Παράρτημα). Οι λειτουργίες αυτές αποτέλεσαν τις δύο από τις τρεις πιο στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένες βιολογικές λειτουργικές κατηγορίες γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3

(Ενότητα 4.5.3) (Πίνακας 4.1) (Εικόνα 4.10), οι οποίες σχετίζονται άμεσα με τη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας του αρτηριακού τοιχώματος και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό [220].

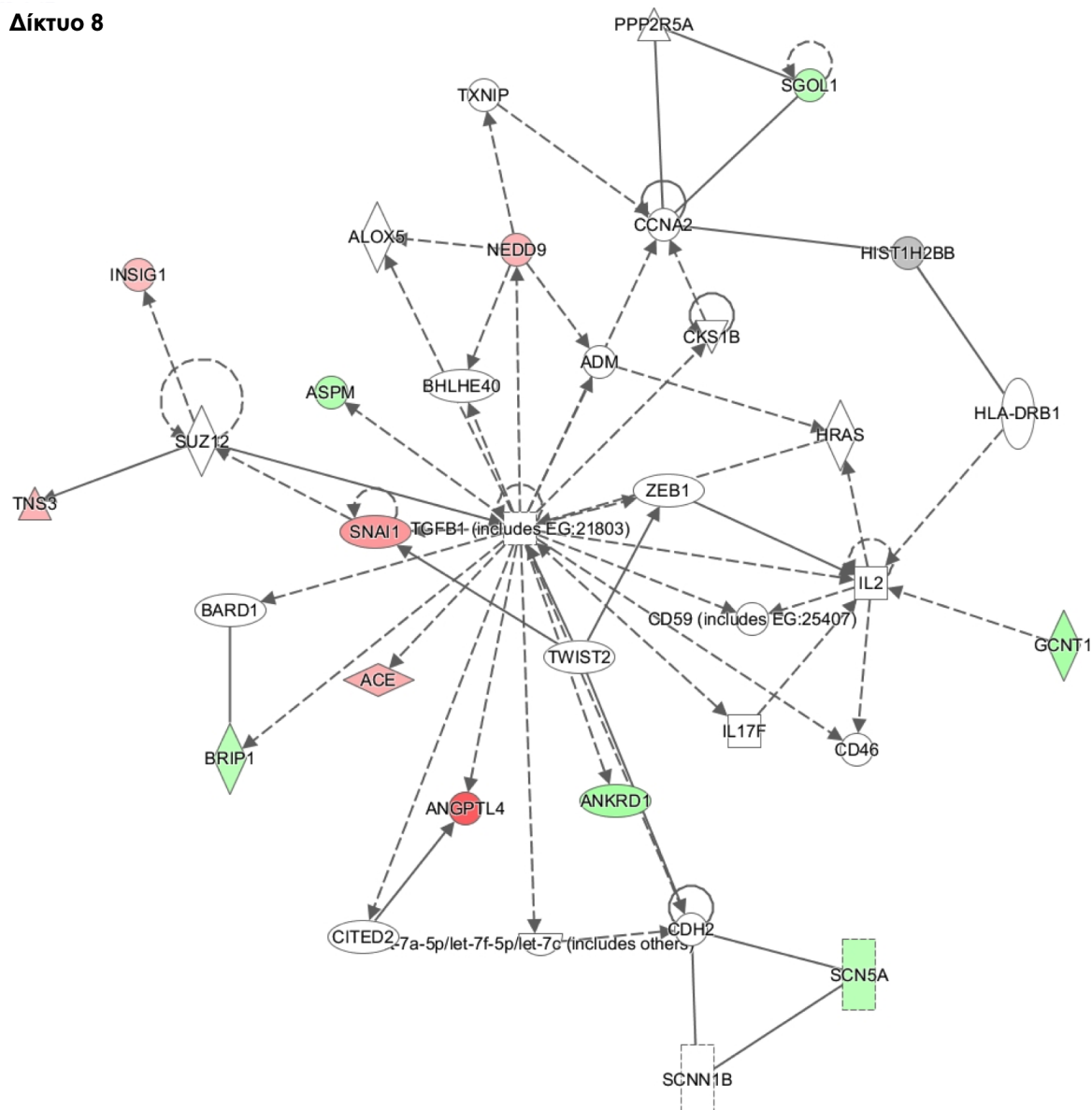
Στην Εικόνα 4.12 απεικονίζεται ένα άλλο αντιπροσωπευτικό δίκτυο (8ο δίκτυο) των HAEC κυττάρων που επηρεάζεται από την έκθεση στην rHDL-apoE3 το οποίο περιέχει πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από 12 αλλαγμένα γονίδια και φέρει σχετικά υψηλή τιμή Σκορ. Οι δύο από τις τρεις πιο στατιστικώς σημαντικές βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών του δικτύου είναι “η Κυτταρική Αύξηση και ο Πολλαπλασιασμός” και “η Φλεγμονώδης Απόκριση” (Πίνακας 3 – Παράρτημα). “Η Κυτταρική Αύξηση και ο Πολλαπλασιασμός” προστατεύουν την ακεραιότητα του ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος και συμβάλουν στην αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου [220]. Η “Φλεγμονώδης Απόκριση” που χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος και επακόλουθη χημειοταξία και ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων της κυκλοφορίας (μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα) μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (Ενότητες 1.1.2 και 1.1.3.2) [6] [24] [30].

Τέλος, στην Εικόνα 4.13 απεικονίζεται ένα άλλο χαρακτηριστικό δίκτυο (4ο δίκτυο) των HAEC κυττάρων που επηρεάζεται από την έκθεση στην rHDL-apoE3 το οποίο περιέχει πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από 18 αλλαγμένα γονίδια και φέρει υψηλή τιμή Σκορ. Οι δύο από τις τρεις πιο στατιστικώς σημαντικές βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών του δικτύου είναι η “Χημειοταξία των Κυττάρων του Ανοσοποιητικού Συστήματος” και η “Διακυτταρική Σηματοδότηση και Επικοινωνία” (Πίνακας 3 – Παράρτημα). Οι δύο αυτές λειτουργίες σχετίζονται με την ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Ειδικότερα, η χημειοταξία των φλεγμονωδών κυττάρων της κυκλοφορίας (μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα) (“Χημειοταξία των Κυττάρων του Ανοσοποιητικού Συστήματος”) στο αρτηριακό τοίχωμα, η οποία επάγεται μέσω αλληλεπίδρασης των κυττάρων αυτών με μόρια προσκόλλησης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων του έσω χιτώνα ή μέσω έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών/χημειοκινών από τα τοπικά μακροφάγα-αφρώδη κύτταρα (“Διακυτταρική Σηματοδότηση και Επικοινωνία”) (Ενότητες 1.1.2 και 1.1.3.2), προάγει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [7] [24] [30].



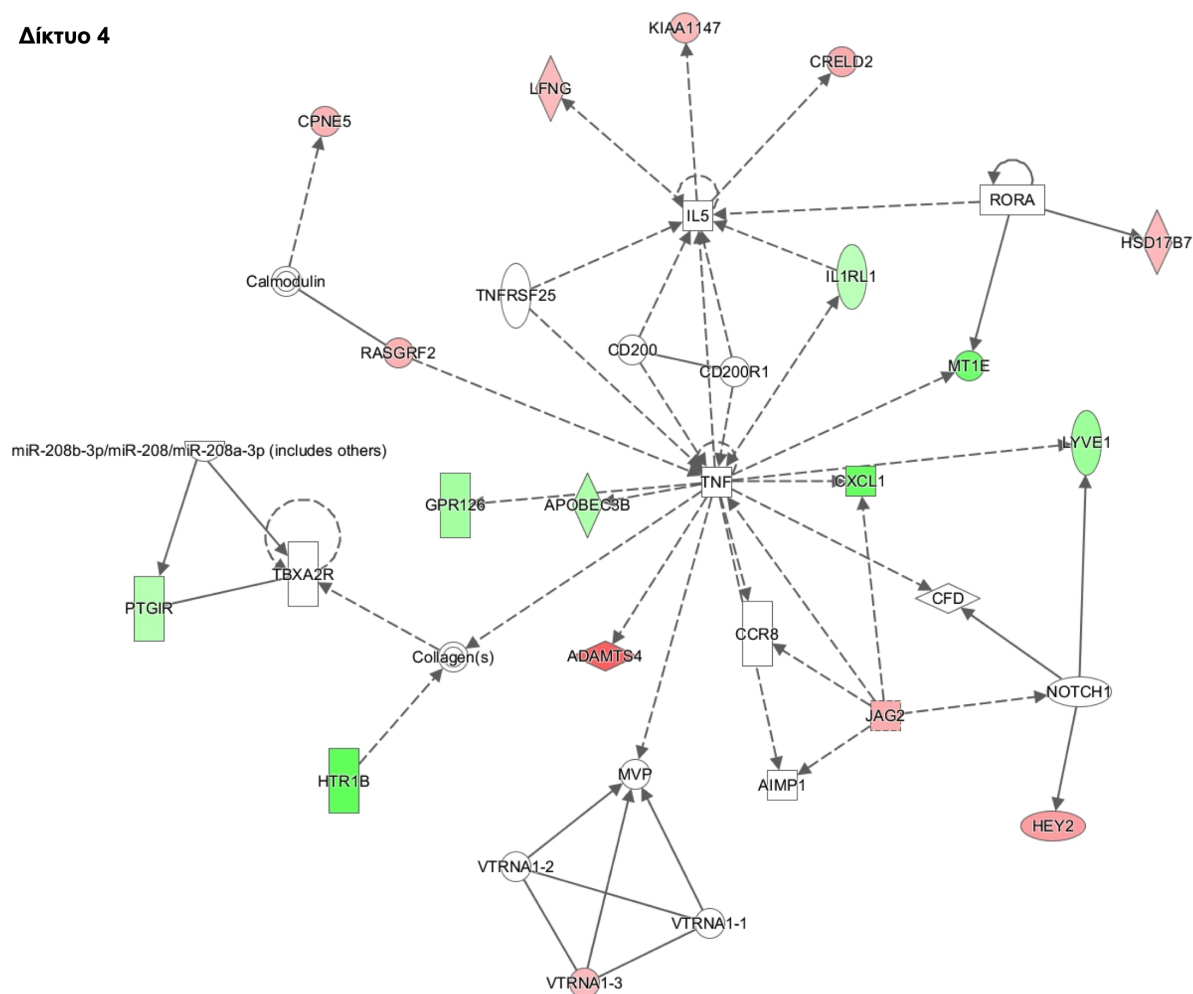
Εικόνα 4.11: Διαγραμματική αναπαράσταση του 5^{ου} δικτύου στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα 17 στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3. Με κόκκινο και πράσινο αναπαριστώνται τα γονίδια που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται, αντίστοιχα, στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-apoE3, τα οποία κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του δικτύου. Με λευκό αναπαριστώνται όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων του Ingenuity με τις οποίες σχετίζονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα αλλαγμένα γονίδια. Στο δίκτυο αναπαριστώνται οι συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι σχετίζονται με “την Κυτταρική Αύξηση και τον Πολλαπλασιασμό” και “τον Κυτταρικό Θάνατο και την Επιβίωση”. Το δίκτυο προέκυψε από την «Ανάλυση Δικτύων» του λογισμικού IPA.

Δίκτυο 8



Εικόνα 4.12: Διαγραμματική αναπαράσταση του 8^{ου} δικτύου στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα 12 στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3. Με κόκκινο και πράσινο αναπαριστώνται τα γονίδια που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται, αντίστοιχα, στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-apoE3, τα οποία κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του δικτύου. Με λευκό αναπαριστώνται όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων του Ingenuity με τις οποίες σχετίζονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα αλλαγμένα γονίδια. Στο δίκτυο αναπαριστώνται οι συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι σχετίζονται με “την Κυτταρική Αύξηση και τον Πολλαπλασιασμό” και τη “Φλεγμονώδη Απόκριση”. Το δίκτυο προέκυψε από την «Ανάλυση Δικτύων» του λογισμικού IPA.

Δίκτυο 4



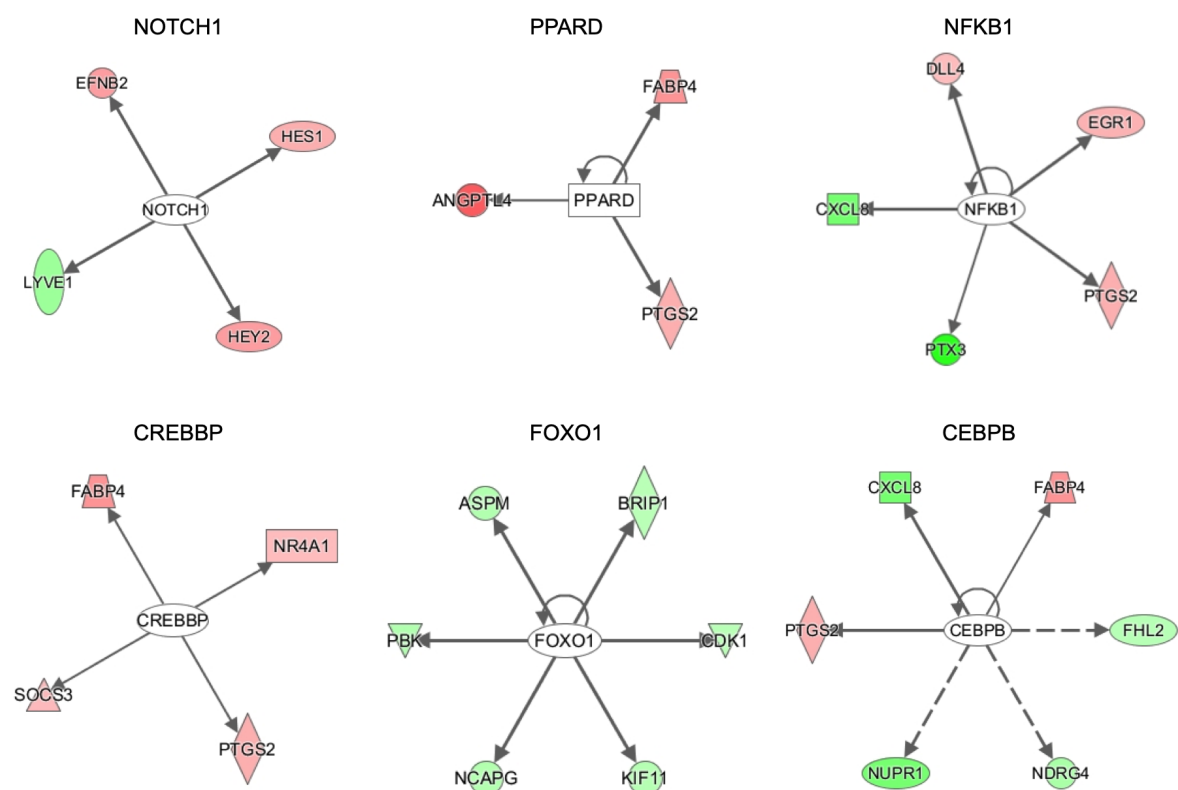
Εικόνα 4.13: Διαγραμματική αναπαράσταση του 4^{ου} δικτύου στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα 18 στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3. Με κόκκινο και πράσινο αναπαριστώνται τα γονίδια που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται, αντίστοιχα, στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-apoE3, τα οποία κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του δικτύου. Με λευκό αναπαριστώνται όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων του Ingenuity με τις οποίες σχετίζονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα αλλαγμένα γονίδια. Στο δίκτυο αναπαριστώνται οι συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι εμπλέκονται στην “Διακυτταρική Σηματοδότηση και Επικοινωνία” και στην “Χημειοταξία των Κυττάρων του Ανοσοποιητικού Συστήματος”. Το δίκτυο προέκυψε από την «Ανάλυση Δικτύων» του λογισμικού IPA.

4.5.5. Ανάλυση πρόβλεψης μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3, με βάση την “Κεντρική Ανάλυση” IPA

Με βάση τη βιοπληροφορική ανάλυση πρόβλεψης μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών της “Κεντρικής Ανάλυσης” IPA («Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών», «Upstream Regulator Analysis») (Ενότητα 3.19.2.2.4) προέκυψε ότι συνολικά θα μπορούσαν να εμπλέκονται 82 διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες/μεταγραφικοί ρυθμιστές στη ρύθμιση της έκφρασης των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 (Πίνακας 4 – Παράρτημα). Η ανάλυση αυτή εντοπίζει τους μεταγραφικούς παράγοντες/μεταγραφικούς ρυθμιστές που ενδεχομένως να ευθύνονται για τις παρατηρούμενες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης, και τους κατατάσσει με βάση την τιμή *P*-value επικάλυψης (ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το *P*-value < 0,01). Στη συγκεκριμένη ανάλυση συμπεριλαμβάνονται μεταγραφικοί παράγοντες, ενδοκυτταρικά σήματα φωσφορυλίωσης, πυρινικοί υποδοχείς, κινάσες, microRNAs και άλλοι τύποι μορίων που ρυθμίζουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο τη γονιδιακή έκφραση. Κάθε μεταγραφικός παράγοντας/μεταγραφικός ρυθμιστής συμβάλλει στη ρύθμιση της έκφρασης περισσότερων του ενός στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζει και ο ίδιος αλλαγμένη έκφραση.

Στην «Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών» έγινε, επίσης, πρόβλεψη της ενεργοποίησης ή καταστολής των προβλεπόμενων μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών στα HAEC από την rHDL-apoE3. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ενεργοποίησης ή καταστολής μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών των HAEC κυττάρων μετά από επώαση με την rHDL-apoE3, όπως προβλέπεται από το σύνολο των αλλαγών έκφρασης των γονιδίων-στόχων τους, παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.14. Στην πρόβλεψη αυτή λαμβάνεται, επίσης, υπόψη η αναμενόμενη ρύθμιση της έκφρασης του κάθε γονιδίου-στόχου από τον εκάστοτε μεταγραφικό παράγοντα/μεταγραφικό ρυθμιστή με βάση την επιστημονική βιβλιογραφία. Με βάση τις παρατηρούμενες αλλαγές έκφρασης των γονιδίων-στόχων, προβλέπεται η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών NOTCH1 (4 γονίδια-στόχοι, *P*-value = $7,01 \times 10^{-4}$), PPARD (3 γονίδια-στόχοι, *P*-value = $1,68 \times 10^{-3}$), NFKB1 (5 γονίδια-στόχοι, *P*-value = $6,63 \times 10^{-3}$) και του ρυθμιστή CREBBP (4 γονίδια-στόχοι, *P*-value = $1,09 \times 10^{-2}$) στα HAEC κύτταρα από την rHDL-apoE3. Αντίθετα, οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO1 (6 γονίδια στόχοι, *P*-value =

$5,65 \times 10^{-4}$) και CEBPB (6 γονίδια στόχοι, $P\text{-value} = 2,77 \times 10^{-2}$) προβλέπεται με στατιστική σημαντικότητα ότι καταστέλλονται στα HAEC κύτταρα από την rHDL-αροΕ3. Οι προαναφερόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες/μεταγραφικοί ρυθμιστές προβλέπεται με στατιστική σημαντικότητα ότι ρυθμίζουν την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 με κεντρικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική αύξηση και ο πολλαπλασιασμός ή η διαφοροποίηση (FOXO1, NOTCH1, PPARD, NFKB1, CREBBP, CEBPB), η απόπτωση ή η επιβίωση (FOXO1, NOTCH1, PPARD, NFKB1), η κυτταρική μετανάστευση (FOXO1, NOTCH1, PPARD), η φλεγμονώδης απόκριση (NOTCH1, PPARD, NFKB1, CEBPB) και ο μεταβολισμός λιπιδίων (PPARD).



Εικόνα 4.14: Διαγραμματική αναπαράσταση αντιπροσωπευτικών μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών και των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων-στόχων τους στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3. Με κόκκινο και πράσινο αναπαριστώνται τα γονίδια που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται, αντίστοιχα, στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-αροΕ3, ενώ με λευκό αυτά που δεν παρουσιάζουν αλλαγές έκφρασης με μικροσυστοιχίες (→ υποδηλώνει επαγωγική γονιδιακή έκφραση). Οι μεταγραφικοί παράγοντες/μεταγραφικοί ρυθμιστές προέκυψαν από την ανάλυση πρόβλεψης μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών («Ανάλυση Μεταγραφικών Ρυθμιστών») του λογισμικού IPA. Σύμφωνα με την ανάλυση

αυτή, προβλέπεται η ενεργοποίηση των NOTCH1, PPARD, NFKB1 και CREBBP στα HAEC κύτταρα από την rHDL-apoE3, ενώ οι FOXO1 και CEBPB προβλέπεται ότι καταστέλλονται από την rHDL-apoE3 στα κύτταρα αυτά.

4.6. Η rHDL-apoE3 επάγει μεταγραφικές αλλαγές σε σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης των HAEC κυττάρων

4.6.1. Ανάλυση των αλλαγμένων γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της βάσης δεδομένων PubMed

Η «Κεντρική Ανάλυση» IPA ανέδειξε ως εξέχουσας σημασίας τις βιολογικές/μοριακές λειτουργίες της κυτταρικής κίνησης, της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού, του κυτταρικού θανάτου και της επιβίωσης, καθώς και του κυτταρικού κύκλου των HAEC κυττάρων που επώαστηκαν με την rHDL-apoE3. Οι λειτουργίες αυτές προέκυψαν ως στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένες μετά από έκθεση των HAEC κυττάρων στην rHDL-apoE3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS (Ενότητα 4.5.3) (Πίνακας 4.1) (Εικόνα 4.10), αλλά παρουσιάζουν και ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς ελέγχουν την ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος και ρυθμίζουν την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό [214] [220]. Η διατάραξη της ενδοθηλιακής ακεραιότητας (τραυματισμός του ενδοθηλίου) του αγγειακού τοιχώματος επάγει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [22] [24]. Η επαγωγή της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε συνδυασμό με την αναστολή της απόπτωσης στα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας του αρτηριακού τοιχώματος, προάγουν την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου και προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση [206] [214] [220]. Προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος η επίδραση της rHDL-apoE3 στη μετανάστευση, στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην απόπτωση και στην επιβίωση των HAEC κυττάρων, και να χαρακτηριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της σε κυτταρικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε ενδελεχής ανάλυση των αλλαγμένων γονιδίων που σχετίζονται με τις λειτουργίες αυτές με τη χρήση της επιστημονικής βιβλιογραφίας στη διεθνή βάση δεδομένων PubMed της NCBI (Data Mining) (Ενότητα 3.19.2.3). Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε εκτενής αναζήτηση της διεθνούς επιστημονικής

βιβλιογραφίας για τα αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 τα οποία ομαδοποιήθηκαν μέσω της «Κεντρικής Ανάλυσης» IPA στις λειτουργικές κατηγορίες: “Κυτταρική Κίνηση” (64 γονίδια), “Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός” (75 γονίδια), “Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση” (63 γονίδια) και “Κυτταρικός Κύκλος” (11 γονίδια). Για κάθε ένα γονίδιο μελετήθηκαν κατά μέσο όρο 10 δημοσιεύσεις για την εκάστοτε βιολογική/μοριακή λειτουργία, οι οποίες αναφέρονταν σε ενδοθηλιακά κύτταρα (συνολικά άνω των 2.500 δημοσιεύσεων).

4.6.2. Σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα

Με βάση τα ευρήματα της PubMed ανάλυσης για τη βιολογική λειτουργία “Κυτταρική Κίνηση” (64 γονίδια) προέκυψε ότι η rHDL-αροΕ3 προκαλεί σημαντικές αλλαγές σε 44 γονίδια των HAEC κυττάρων (23 υπερεκφράζονται και 21 υποεκφράζονται) τα οποία σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Πίνακας 4.2). Τα 44 αυτά γονίδια αναλύθηκαν περαιτέρω μέσω ενδεδειγμένης αναζήτησης της διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας (PubMed), και προέκυψε ότι τα 42 εξ' αυτών (με εξαίρεση τα CXCL11 και ANKRD1) συμμετέχουν σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (Πίνακας 4.2) (Εικόνα 4.15): 1) Το μονοπάτι μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2 (30 γονίδια: 17 υπερεκφράζονται και 13 υποεκφράζονται), 2) το μονοπάτι μετανάστευσης PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 (28 γονίδια: 16 υπερεκφράζονται και 12 υποεκφράζονται), 3) το μονοπάτι μετανάστευσης καθοδικά των μικρών RHO-GTPασών (RHOA και RAC1) (25 γονίδια: 16 υπερεκφράζονται και 9 υποεκφράζονται) και 4) το μονοπάτι μετανάστευσης καθοδικά των ιντεγκρινών στις εστίες κυτταρικής προσκόλλησης (15 γονίδια: 8 υπερεκφράζονται και 7 υποεκφράζονται). Εξαίρεση αποτέλεσαν τα γονίδια CXCL11 (-2,531) και ANKRD1 (-2,834) για τα οποία δε βρέθηκαν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου επάγουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

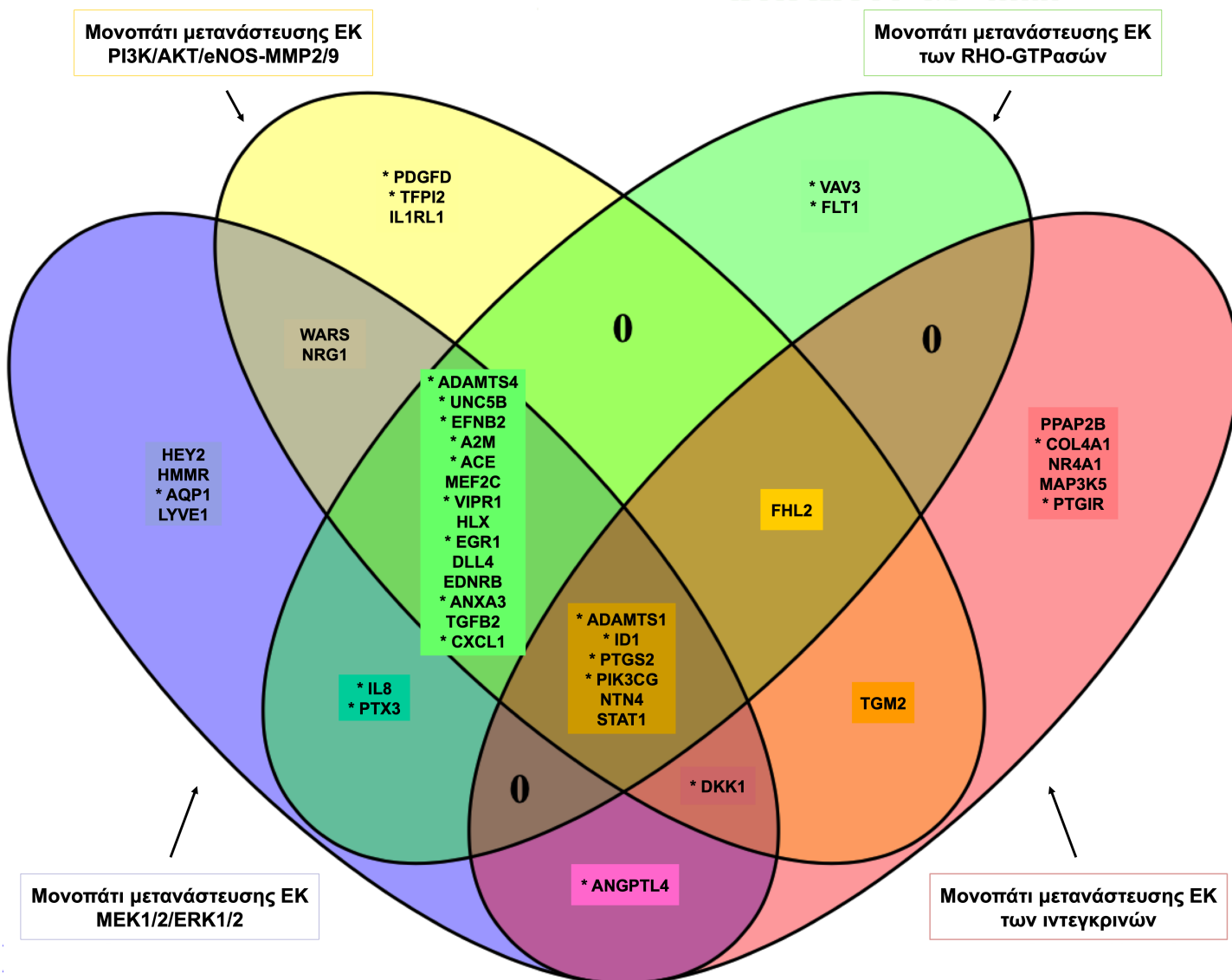
Αναλυτικότερα, στην Εικόνα 4.15 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα Venn που απεικονίζει τα 42 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 τα οποία συμμετέχουν στα τέσσερα μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων: 1) MEK1/2/ERK1/2, 2) PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, 3) των RHO-GTPασών και 4) των ιντεγκρινών. Σε κάθε περιοχή του διαγράμματος Venn παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια εκ του συνόλου των 42 γονιδίων μεταξύ δύο ή περισσότερων από τα προαναφερόμενα μονοπάτια

μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Ειδικότερα, η πλειοψηφία των γονιδίων συμμετέχουν σε περισσότερα από ένα μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, με 14 εξ' αυτών (33,3%) να εμπλέκονται στα μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών: ADAMTS4, UNC5B, EFNB2, A2M, ACE, MEF2C, VIPR1, HLX, EGR1, DLL4, EDNRB, ANXA3, TGFB2 και CXCL1. Ένας μικρότερος αριθμός κοινών γονιδίων (6 γονίδια, 14,3%) είναι κοινά μεταξύ των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, των RHO-GTPασών και των ιντεγκρινών: ADAMTS1, ID1, PTGS2, PIK3CG, NTN4 και STAT1. Ένα μόνο γονίδιο (2,4%, DKK1) συμμετέχει στα μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των ιντεγκρινών, ενώ το FHL2 (2,4%) είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, των RHO-GTPασών και των ιντεγκρινών. Δύο μόνο γονίδια (4,8%, WARS και NRG1) είναι κοινά μεταξύ των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2 και PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, ενώ τα IL8 και PTX3 (4,8%) συμμετέχουν στα μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2 και των RHO-GTPασών. Ένα μόνο γονίδιο (2,4%, ANGPTL4) είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2 και των ιντεγκρινών, ενώ το TGM2 (2,4%) εμπλέκεται στα μονοπάτια PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των ιντεγκρινών. Ένα μικρός αριθμός γονιδίων εμπλέκονται αποκλειστικά σε κάθε ένα από τα τέσσερα μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, 5 γονίδια (11,9%) συμμετέχουν αποκλειστικά στο μονοπάτι των ιντεγκρινών: PPAP2B, COL4A1, NR4A1, MAP3K5 και PTGIR, ενώ 4 γονίδια (9,5%) σχετίζονται μόνο με το μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2: HEY2, HMMR, AQP1 και LYVE1. Τρία γονίδια (7,1%) προέκυψε ότι εμπλέκονται αποκλειστικά στο μονοπάτι PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9: PDGFD, TFPI2 και IL1RL1, ενώ τα γονίδια VAV3 και FLT1 (4,8%) συμμετέχουν μόνο στο μονοπάτι των RHO-GTPασών.

Πίνακας 4.2: Πίνακας των τεσσάρων σηματοδοτικών μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS. Για κάθε ένα μονοπάτι παρουσιάζονται τα αλλαγμένα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτό εκ του συνόλου των 42 αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα γονίδια κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση το λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC, όπως προέκυψε από τις μικροσυστοιχίες.

| Γονίδια σχετιζόμενα με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (42 γονίδια) | Λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC (μικροσυ- στοιχίες) | Μονοπάτι μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2 (30 γονίδια) | Μονοπάτι μετανάστευσης PI3K/AKT/eNOS -MMP2/9 (28 γονίδια) | Μονοπάτι μετανάστευσης καθοδικά των μικρών RHO- GTPασών (25 γονίδια) | Μονοπάτι μετανάστευσης καθοδικά των ιντεγκρινών (15 γονίδια) |
|---|--|---|---|--|--|
| ANGPTL4 | 5,281 | ✓ | | | ✓ |
| ADAMTS4 | 5,099 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| VAV3 | 3,787 | | | | |
| ADAMTS1 | 3,757 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| UNC5B | 3,570 | | ✓ | ✓ | |
| EFNB2 | 3,032 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| HEY2 | 2,998 | ✓ | | | |
| FLT1 | 2,768 | | | ✓ | |
| ID1 | 2,522 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| A2M | 2,493 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| ACE | 2,452 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| PTGS2 | 2,436 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| MEF2C | 2,433 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| VIPR1 | 2,424 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| HLX | 2,367 | | ✓ | ✓ | |
| EGR1 | 2,363 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| PIK3CG | 2,238 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| PDGFD | 2,207 | | ✓ | | |
| TFPI2 | 2,166 | | ✓ | | |
| PPAP2B | 2,149 | | | | ✓ |
| COL4A1 | 2,139 | | | | ✓ |

| | | | | | |
|--------|--------|---|---|---|---|
| DLL4 | 2,047 | ✓ | | ✓ | |
| NR4A1 | 2,047 | | | | ✓ |
| TGM2 | -2,000 | | ✓ | | ✓ |
| IL1RL1 | -2,028 | | ✓ | | |
| NTN4 | -2,053 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| EDNRB | -2,063 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| STAT1 | -2,084 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| HMMR | -2,124 | ✓ | | | |
| FHL2 | -2,127 | | ✓ | ✓ | ✓ |
| WARS | -2,143 | ✓ | ✓ | | |
| MAP3K5 | -2,147 | | | | ✓ |
| PTGIR | -2,212 | | | | ✓ |
| AQP1 | -2,352 | ✓ | | | |
| NRG1 | -2,390 | ✓ | ✓ | | |
| ANXA3 | -2,441 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| TGFB2 | -2,741 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| LYVE1 | -2,986 | ✓ | | | |
| DKK1 | -3,649 | ✓ | ✓ | | ✓ |
| IL8 | -4,411 | ✓ | | ✓ | |
| CXCL1 | -4,860 | ✓ | ✓ | ✓ | |
| PTX3 | -7,861 | ✓ | | ✓ | |



Εικόνα 4.15: Διάγραμμα Venn (Venny 2.1.0 - BioinfoGP - CSIC) στο οποίο παρουσιάζονται τα 42 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 που συμμετέχουν σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (EK): 1) Μονοπάτι μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2 (30 γονίδια), 2) μονοπάτι μετανάστευσης PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 (28 γονίδια), 3) μονοπάτι μετανάστευσης καθοδικά των RHO-GTPασών (25 γονίδια) και 4) μονοπάτι μετανάστευσης καθοδικά των ιντεγκρινών (15 γονίδια). Στο διάγραμμα Venn απεικονίζονται τα κοινά γονίδια μεταξύ δύο ή περισσότερων μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Ο αστερίσκος (*) επισημαίνει τα 24 γονίδια που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία αναλύθηκαν με qRT-PCR στα HAEC κύτταρα μετά από

έκθεση στην rHDL-apoE3 και επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφρασή τους (Ενότητα 4.7, Πίνακας 4.7).

4.6.3. Σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα

Με βάση τα ευρήματα της PubMed ανάλυσης για τη βιολογική λειτουργία “Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός” (75 γονίδια) προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 επάγει αλλαγές στην έκφραση 40 γονιδίων των HAEC κυττάρων (22 υπερεκφράζονται και 18 υποεκφράζονται) τα οποία σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα 40 αυτά γονίδια μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω της διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας (PubMed), και προέκυψε ότι τα 37 εξ'αυτών (με εξαίρεση τα HEY2, MEF2C και FST) συμμετέχουν σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (Πίνακας 4.3) (Εικόνα 4.16): 1) Το μονοπάτι πολλαπλασιασμού MEK1/2/ERK1/2 (31 γονίδια: 15 υπερεκφράζονται και 16 υποεκφράζονται), 2) το μονοπάτι πολλαπλασιασμού PI3K/AKT (17 γονίδια: 9 υπερεκφράζονται και 8 υποεκφράζονται) και 3) το μονοπάτι πολλαπλασιασμού καθοδικά των ιντεγκρινών (7 γονίδια: 4 γονίδια υπερεκφράζονται και 3 γονίδια υποεκφράζονται). Εξαίρεση αποτέλεσαν τα γονίδια HEY2 (2,998), MEF2C (2,433) και FST (-2,785) για τα οποία δε βρέθηκαν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.

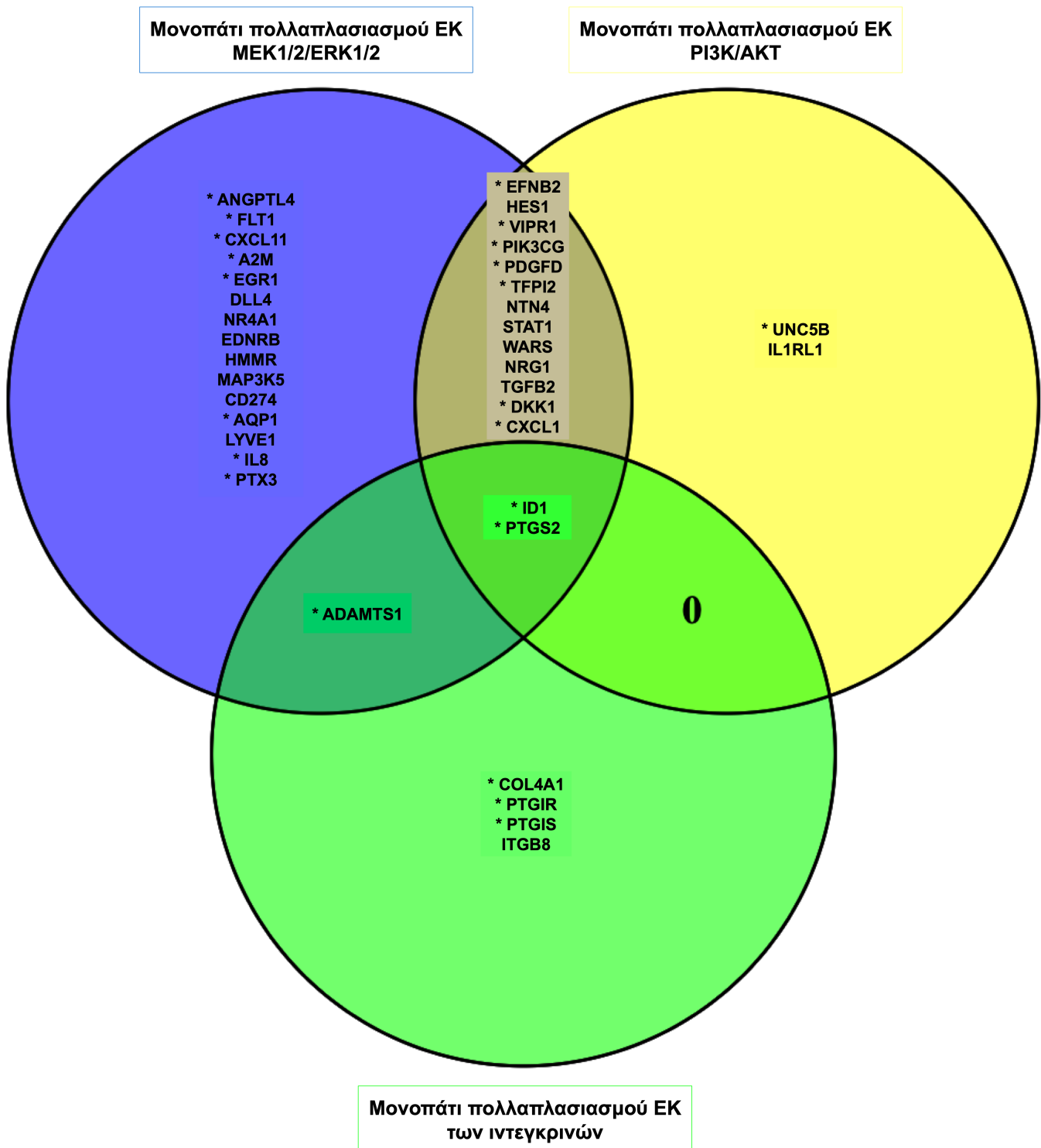
Αναλυτικότερα, στην Εικόνα 4.16 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα Venn που απεικονίζει τα 37 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 τα οποία συμμετέχουν στα τρία μονοπάτια πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων: 1) MEK1/2/ERK1/2, 2) PI3K/AKT και 3) των ιντεγκρινών. Σε κάθε περιοχή του διαγράμματος Venn παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια εκ του συνόλου των 37 γονιδίων μεταξύ δύο ή περισσότερων από τα προαναφερόμενα μονοπάτια πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Η πλειοψηφία των γονιδίων συμμετέχει αποκλειστικά στο μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2 (15 γονίδια, 40,5%): ANGPTL4, FLT1, CXCL11, A2M, EGR1, DLL4, NR4A1, EDNRB, HMMR, MAP3K5, CD274, AQP1, LYVE1, IL8 και PTX3, ενώ ένας μικρότερος αριθμός γονιδίων εμπλέκονται αποκλειστικά σε κάθε ένα από τα άλλα δύο μονοπάτια. Ειδικότερα, τα UNC5B και IL1RL1 (5,4%) σχετίζονται μόνο με το μονοπάτι PI3K/AKT, ενώ τα COL4A1, PTGIR, PTGIS

και ITGB8 (10,8%) συμμετέχουν αποκλειστικά στο μονοπάτι των ιντεγκρινών. Δεκατρία γονίδια (35,1%) είναι κοινά μεταξύ των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2 και PI3K/AKT: EFN2, HES1, VIPR1, PIK3CG, PDGFD, TFPI2, NTN4, STAT1, WARS, NRG1, TGFB2, DKK1 και CXCL1, ενώ τα ID1 και PTGS2 (5,4%) συμμετέχουν και στα τρία μονοπάτια, MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT και των ιντεγκρινών. Ένα μόνο γονίδιο (2,7%, ADAMTS1) είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2 και των ιντεγκρινών, ενώ δεν υπάρχει κανένα κοινό γονίδιο μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT και των ιντεγκρινών.

Πίνακας 4.3: Πίνακας των τριών σηματοδοτικών μονοπατιών πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-αποE3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS. Για κάθε ένα μονοπάτι παρουσιάζονται τα αλλαγμένα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτό εκ του συνόλου των 37 αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα γονίδια κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση το λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC, σύμφωνα με τις μικροσυστοιχίες.

| Γονίδια σχετιζόμενα με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (37 γονίδια) | Λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC (μικροσυ- στοιχίες) | Μονοπάτι πολλαπλασιασμού MEK1/2/ERK1/2 (31 γονίδια) | Μονοπάτι πολλαπλασιασμού PI3K/AKT (17 γονίδια) | Μονοπάτι πολλαπλασιασμού καθοδικά των ιντεγκρινών (7 γονίδια) |
|---|--|--|---|---|
| ANGPTL4 | 5,281 | ✓ | | |
| ADAMTS1 | 3,757 | ✓ | | ✓ |
| UNC5B | 3,570 | | ✓ | |
| EFNB2 | 3,032 | ✓ | ✓ | |
| FLT1 | 2,768 | ✓ | | |
| CXCL11 | 2,531 | ✓ | | |
| ID1 | 2,522 | ✓ | ✓ | ✓ |
| A2M | 2,493 | ✓ | | |
| HES1 | 2,440 | ✓ | ✓ | |
| PTGS2 | 2,436 | ✓ | ✓ | ✓ |
| VIPR1 | 2,424 | ✓ | ✓ | |
| EGR1 | 2,363 | ✓ | | |

| | | | | |
|--------|--------|---|---|---|
| PIK3CG | 2,238 | ✓ | ✓ | |
| PDGFD | 2,207 | ✓ | ✓ | |
| TFPI2 | 2,166 | ✓ | ✓ | |
| COL4A1 | 2,139 | | | ✓ |
| DLL4 | 2,047 | ✓ | | |
| NR4A1 | 2,047 | ✓ | | |
| IL1RL1 | -2,028 | | ✓ | |
| NTN4 | -2,053 | ✓ | ✓ | |
| EDNRB | -2,063 | ✓ | | |
| STAT1 | -2,084 | ✓ | ✓ | |
| HMMR | -2,124 | ✓ | | |
| WARS | -2,143 | ✓ | ✓ | |
| MAP3K5 | -2,147 | ✓ | | |
| CD274 | -2,156 | ✓ | | |
| PTGIR | -2,212 | | | ✓ |
| PTGIS | -2,284 | | | ✓ |
| AQP1 | -2,352 | ✓ | | |
| NRG1 | -2,390 | ✓ | ✓ | |
| TGFB2 | -2,741 | ✓ | ✓ | |
| ITGB8 | -3,174 | | | ✓ |
| DKK1 | -3,649 | ✓ | ✓ | |
| LYVE1 | -2,986 | ✓ | | |
| IL8 | -4,411 | ✓ | | |
| CXCL1 | -4,860 | ✓ | ✓ | |
| PTX3 | -7,861 | ✓ | | |



Εικόνα 4.16: Διάγραμμα Venn (Venny 2.1.0 - BioinfoGP - CSIC) στο οποίο παρουσιάζονται τα 37 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 που συμμετέχουν σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ): 1) Μονοπάτι πολλαπλασιασμού MEK1/2/ERK1/2 (31 γονίδια), 2) μονοπάτι πολλαπλασιασμού PI3K/AKT (17 γονίδια), 3) μονοπάτι πολλαπλασιασμού καθοδικά των ιντεγκρινών (7 γονίδια). Στο διάγραμμα Venn

απεικονίζονται τα κοινά γονίδια μεταξύ δύο ή περισσότερων μονοπατιών πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Ο αστερίσκος (*) επισημαίνει τα 22 γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία αναλύθηκαν με qRT-PCR στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 και επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφρασή τους (Ενότητα 4.7, Πίνακας 4.7).

4.6.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα

Με βάση τα ευρήματα της PubMed ανάλυσης για τη βιολογική λειτουργία “Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός” (75 γονίδια) προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 επάγει αλλαγές στην έκφραση 30 γονιδίων των HAEC κυττάρων (16 υπερεκφράζονται και 14 υποεκφράζονται) τα οποία σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα 30 αυτά γονίδια μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω της διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας (PubMed), και προέκυψε ότι τα 25 εξ’ αυτών (με εξαίρεση τα MEF2C, VIPR1, TFPI2, PTGIS και NRG1) εμπλέκονται σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (Πίνακας 4.4) (Εικόνα 4.17): 1) Το μονοπάτι διαφοροποίησης PI3K/AKT/eNOS (20 γονίδια: 10 υπερεκφράζονται και 10 υποεκφράζονται), 2) το μονοπάτι διαφοροποίησης MEK1/2/ERK1/2 (7 γονίδια: 4 υπερεκφράζονται και 3 υποεκφράζονται) και 3) το μονοπάτι διαφοροποίησης καθοδικά των ιντεγκρινών (2 γονίδια που υπερεκφράζονται). Εξαίρεση αποτέλεσαν τα γονίδια MEF2C (2,433), VIPR1 (2,424), TFPI2 (2,166), PTGIS (-2,284) και NRG1 (-2,390) για τα οποία δε βρέθηκαν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου ελέγχουν τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

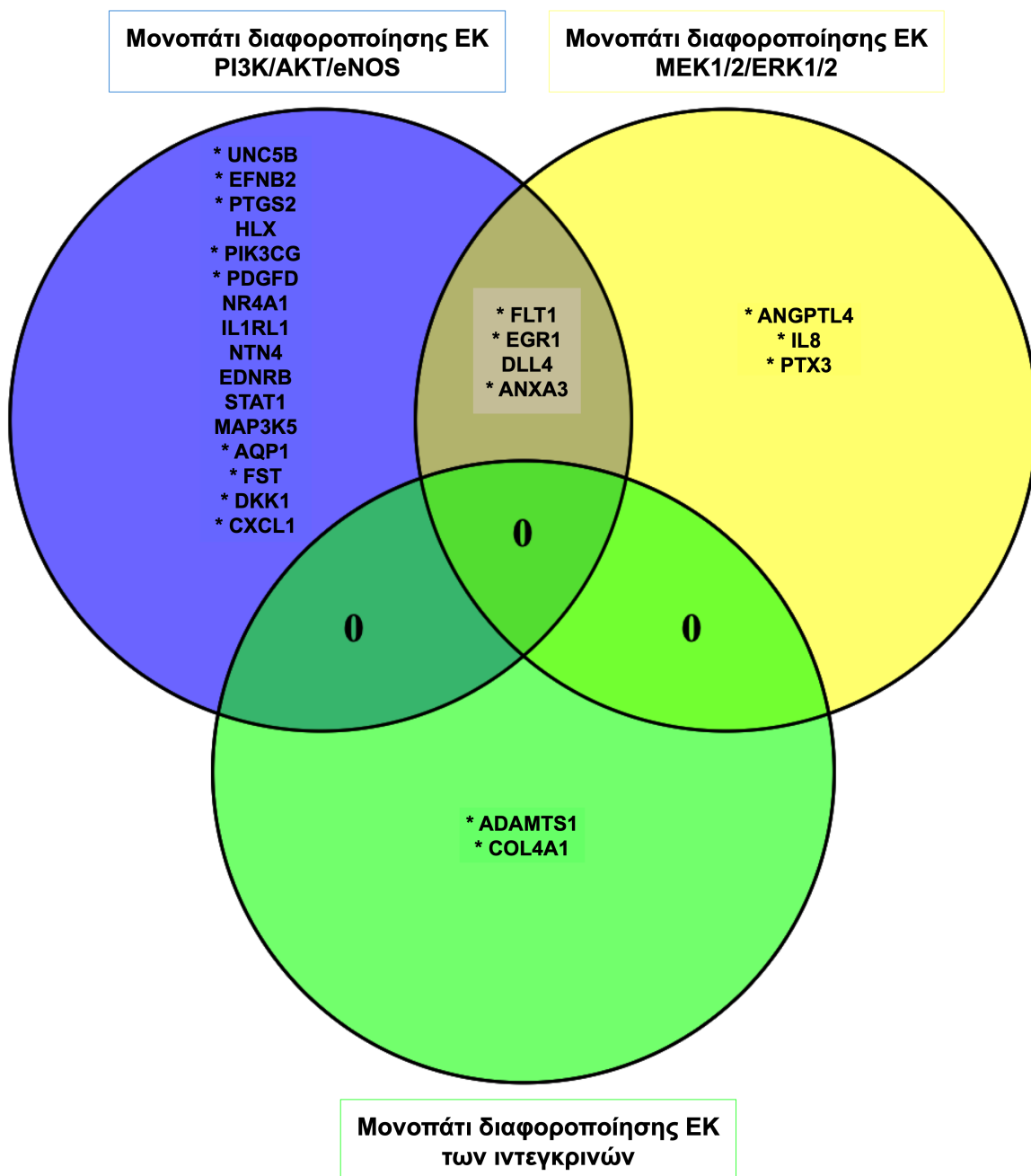
Στην Εικόνα 4.17 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα Venn που απεικονίζει τα 25 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 τα οποία συμμετέχουν στα τρία μονοπάτια διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων: 1) PI3K/AKT/eNOS, 2) MEK1/2/ERK1/2 και 3) των ιντεγκρινών. Σε κάθε περιοχή του διαγράμματος Venn παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια εκ του συνόλου των 25 γονιδίων μεταξύ δύο ή περισσότερων από τα προαναφερόμενα μονοπάτια διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Η πλειοψηφία των γονιδίων συμμετέχει αποκλειστικά στο μονοπάτι PI3K/AKT/eNOS (16 γονίδια, 64%): UNC5B, EFNB2, PTGS2, HLX, PIK3CG, PDGFD, NR4A1, IL1RL1, NTN4, EDNRB, STAT1, MAP3K5, AQP1, FST, DKK1 και CXCL1), ενώ ένας μικρότερος αριθμός γονιδίων

εμπλέκονται αποκλειστικά σε κάθε ένα από τα άλλα δύο μονοπάτια. Ειδικότερα, τα ANGPTL4, IL8 και PTX3 (12%) σχετίζονται μόνο με το μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2, ενώ τα ADAMTS1 και COL4A1 (8%) συμμετέχουν αποκλειστικά στο μονοπάτι των ιντεγκρινών. Τέσσερα γονίδια (16%) είναι κοινά μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT/eNOS και MEK1/2/ERK1/2: FLT1, EGR1, DLL4 και ANXA3. Δεν υπάρχει κανένα κοινό γονίδιο μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT/eNOS και των ιντεγκρινών καθώς και μεταξύ των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2 και των ιντεγκρινών. Κανένα γονίδιο δεν είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT/eNOS, MEK1/2/ERK1/2 και των ιντεγκρινών.

Πίνακας 4.4: Πίνακας των τριών σηματοδοτικών μονοπατιών διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-apoE3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS. Για κάθε ένα μονοπάτι παρουσιάζονται τα αλλαγμένα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτό εκ του συνόλου των 25 αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα γονίδια κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση το λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC, σύμφωνα με τις μικροσυστοιχίες.

| Γονίδια σχετιζόμενα με τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (25 γονίδια) | Λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC (μικροσυ- στοιχίες) | Μονοπάτι διαφοροποίησης PI3K/AKT/eNOS (20 γονίδια) | Μονοπάτι διαφοροποίησης MEK1/2/ERK1/2 (7 γονίδια) | Μονοπάτι διαφοροποίησης καθοδικά των ιντεγκρινών (2 γονίδια) |
|---|--|---|--|--|
| ANGPTL4 | 5,281 | | ✓ | |
| ADAMTS1 | 3,757 | | | ✓ |
| UNC5B | 3,570 | ✓ | | |
| EFNB2 | 3,032 | ✓ | | |
| FLT1 | 2,768 | ✓ | ✓ | |
| PTGS2 | 2,436 | ✓ | | |
| HLX | 2,367 | ✓ | | |
| EGR1 | 2,363 | ✓ | ✓ | |
| PIK3CG | 2,238 | ✓ | | |
| PDGFD | 2,207 | ✓ | | |
| COL4A1 | 2,139 | | | ✓ |

| | | | | |
|--------|--------|---|---|--|
| DLL4 | 2,047 | ✓ | ✓ | |
| NR4A1 | 2,047 | ✓ | | |
| IL1RL1 | -2,028 | ✓ | | |
| NTN4 | -2,053 | ✓ | | |
| EDNRB | -2,063 | ✓ | | |
| STAT1 | -2,084 | ✓ | | |
| MAP3K5 | -2,147 | ✓ | | |
| AQP1 | -2,352 | ✓ | | |
| ANXA3 | -2,441 | ✓ | ✓ | |
| FST | -2,785 | ✓ | | |
| DKK1 | -3,649 | ✓ | | |
| IL8 | -4,411 | | ✓ | |
| CXCL1 | -4,860 | ✓ | | |
| PTX3 | -7,861 | | ✓ | |



Εικόνα 4.17: Διάγραμμα Venn (Venny 2.1.0 - BioinfoGP - CSIC) στο οποίο παρουσιάζονται τα 25 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 που συμμετέχουν σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ): 1) Μονοπάτι διαφοροποίησης PI3K/AKT/eNOS (20 γονίδια), 2) μονοπάτι διαφοροποίησης MEK1/2/ERK1/2 (7 γονίδια), 3) μονοπάτι διαφοροποίησης καθοδικά των ιντεγκρινών (2 γονίδια). Στο διάγραμμα Venn απεικονίζονται τα κοινά γονίδια μεταξύ δύο ή περισσότερων μονοπατιών διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα

μονοπάτι. Ο αστερίσκος (*) επισημαίνει τα 17 γονίδια που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία αναλύθηκαν με qRT-PCR στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 και επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφρασή τους (Ενότητα 4.7, Πίνακας 4.7).

4.6.5. Σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα

Με βάση τη τα ευρήματα της PubMed ανάλυσης για τη βιολογική λειτουργία “Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση” (63 γονίδια) προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 επάγει αλλαγές στην έκφραση 36 γονιδίων των HAEC κυττάρων (19 υπερεκφράζονται και 17 υποεκφράζονται) τα οποία σχετίζονται με την απόπτωση ή/και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα 36 αυτά γονίδια μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω της διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας (PubMed), και προέκυψε ότι τα 33 εξ’ αυτών (με εξαίρεση τα ANKRD1, CXCL11, ITGB8) εμπλέκονται σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης ή/και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (Πίνακας 4.5) (Εικόνες 4.18-4.19): 1) Το μιτοχondριακό μονοπάτι απόπτωσης του κυτοχρώματος C (cytoC) (17 γονίδια: 9 υπερεκφράζονται και 8 υποεκφράζονται), 2) το μονοπάτι απόπτωσης των p38 MAPK ή/και JNK κινασών (5 γονίδια: 1 υπερεκφράζεται και 4 υποεκφράζονται), 3) το μονοπάτι απόπτωσης των υποδοχέων θανάτου (4 γονίδια που υπερεκφράζονται), 4) το μονοπάτι απόπτωσης του P53 (3 γονίδια: 1 υπερεκφράζεται και 2 υποεκφράζονται), 5) το μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT (14 γονίδια: 10 υπερεκφράζονται και 4 υποεκφράζονται), 6) το αντι-αποπτωτικό μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2 (2 γονίδια: 1 υπερεκφράζεται και 1 υποεκφράζεται) και 7) το αντι-αποπτωτικό μονοπάτι του NFκB (1 γονίδιο που υπερεκφράζεται). Εξαίρεση αποτέλεσαν τα γονίδια ANKRD1 (-2,834), CXCL11 (-2,531) και ITGB8 (-3,174) για τα οποία δε βρέθηκαν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου ελέγχουν την απόπτωση ή/και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ειδικότερα, από το σύνολο των 33 γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση ή/και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων βρέθηκε ότι τα 26 γονίδια συμμετέχουν στα τέσσερα μονοπάτια απόπτωσης και ότι τα 14 γονίδια εμπλέκονται στα τρία μονοπάτια επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικά μονοπάτια, τα οποία αναφέρθηκαν παραπάνω. Στην Εικόνα 4.18 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα Venn που απεικονίζει τα 26/33 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 τα οποία συμμετέχουν στα τέσσερα μονοπάτια απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων: 1) το αποπτωτικό μονοπάτι του cytoC,

2) το αποπτωτικό μονοπάτι των p38 MAPK ή/και JNK κινασών, 3) το αποπτωτικό μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου και 4) το αποπτωτικό μονοπάτι του P53. Σε κάθε περιοχή του διαγράμματος Venn παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια εκ του συνόλου των 26 γονιδίων μεταξύ δύο ή περισσότερων από τα προαναφερόμενα μονοπάτια απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Η πλειοψηφία των γονιδίων συμμετέχουν αποκλειστικά στο αποπτωτικό μονοπάτι του cytoC (14 γονίδια, 53,8%): ANGPTL4, SNAI1, ID1, PTGS2, VIPR1, COL4A1, SOCS3, DLL4, EDNRB, PTGIR, PTGIS, AQP1, NRG1 και IL8, ενώ ένας μικρότερος αριθμός γονιδίων (3 γονίδια, 11,5%) εμπλέκονται αποκλειστικά σε κάθε ένα από τα άλλα τρία μονοπάτια απόπτωσης. Ειδικότερα, τα γονίδια RGS5, MAP3K5 και DKK1 συμμετέχουν μόνο στο αποπτωτικό μονοπάτι των p38 MAPK ή/και JNK κινασών, ενώ τα HES1, EGR1 και PIK3CG σχετίζονται αποκλειστικά με το αποπτωτικό μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου. Τα γονίδια UNC5B, TGM2 και NUPR1 συμμετέχουν αποκλειστικά στο αποπτωτικό μονοπάτι του P53. Δεν υπάρχει κανένα γονίδιο που να εμπλέκεται και στα τέσσερα μονοπάτια απόπτωσης, και κανένα γονίδιο δεν είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών του cytoC, των υποδοχέων θανάτου και του P53. Επιπλέον, δεν βρέθηκε κανένα κοινό γονίδιο μεταξύ των μονοπατιών του cytoC, των p38 MAPK ή/και JNK κινασών και του P53 καθώς και μεταξύ των μονοπατιών του cytoC, των p38 MAPK ή/και JNK κινασών και των υποδοχέων θανάτου. Κανένα γονίδιο δεν είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών των p38 MAPK ή/και JNK κινασών, των υποδοχέων θανάτου και του P53. Δύο γονίδια είναι κοινά μεταξύ των μονοπατιών του cytoC και των p38 MAPK ή/και JNK κινασών (7,7%, PRKAA2, UCP2), ενώ το ADAMTS1 (3,8%) συμμετέχει στα μονοπάτια του cytoC και των υποδοχέων θανάτου. Δεν υπάρχει κανένα κοινό γονίδιο μεταξύ των μονοπατιών του cytoC και του P53, καθώς και μεταξύ των μονοπατιών των p38 MAPK ή/και JNK κινασών και των υποδοχέων θανάτου. Κανένα γονίδιο δεν είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών p38 MAPK ή/και JNK κινασών και του P53, καθώς και μεταξύ των μονοπατιών των υποδοχέων θανάτου και του P53.

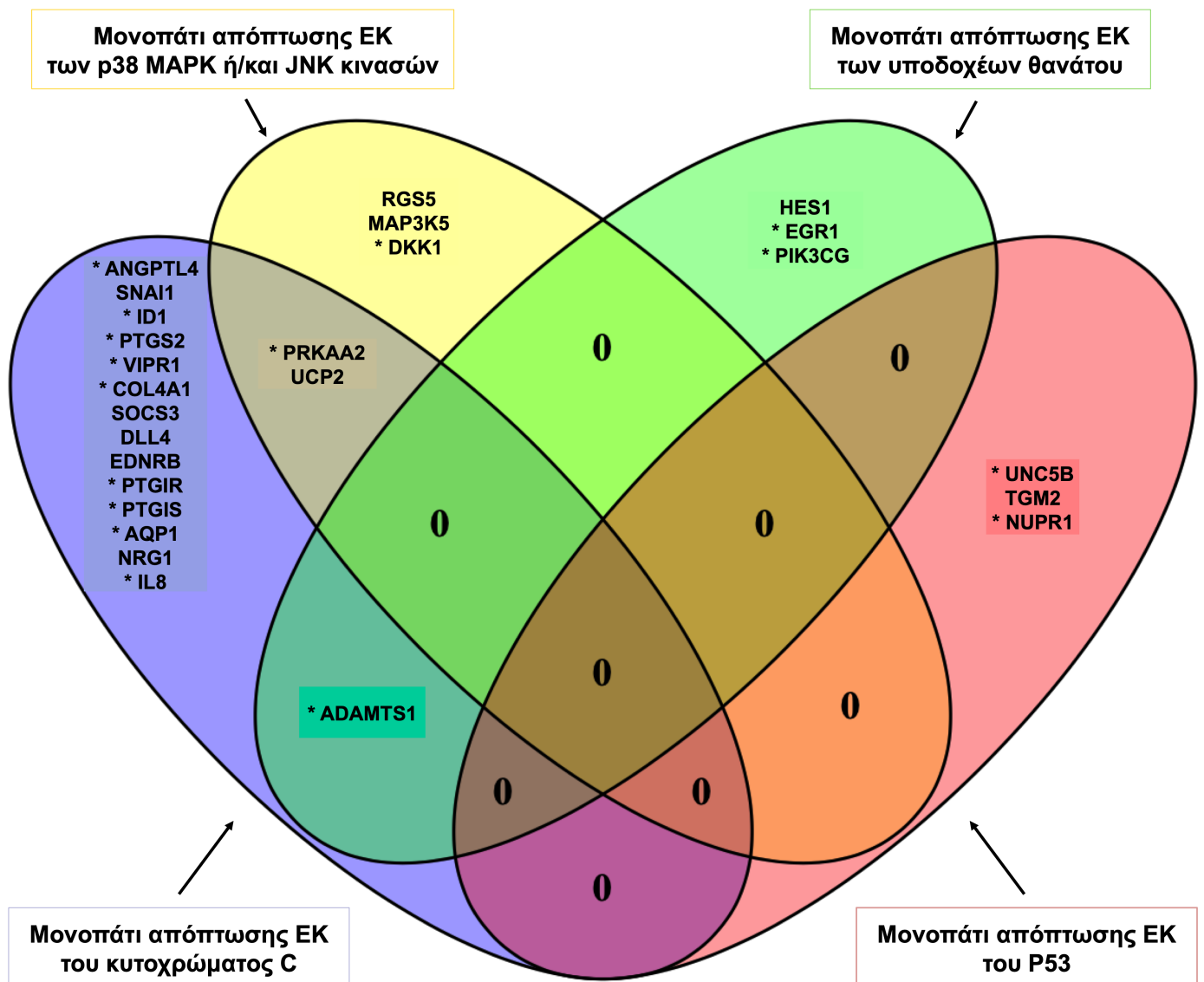
Αντίστοιχα, στην Εικόνα 4.19 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα Venn διάγραμμα που απεικονίζει τα 14/33 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-aroE3 τα οποία συμμετέχουν στα τρία μονοπάτια επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικά μονοπάτια των ενδοθηλιακών κυττάρων: 1) το μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT, 2) το αντι-αποπτωτικό μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2 και 3) το αντι-αποπτωτικό μονοπάτι του NFκB. Σε κάθε περιοχή του διαγράμματος Venn παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια εκ του συνόλου των 14 γονιδίων μεταξύ δύο ή περισσότερων από τα προαναφερόμενα μονοπάτια επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικά μονοπάτια των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που

εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Η πλειοψηφία των γονιδίων συμμετέχουν αποκλειστικά στο μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT (12 γονίδια, 85,7%): UNC5B, FLT1, PTGS2, MEF2C, PIK3CG, PDGFD, TFPI2, SOCS3, NR4A1, NTN4, EDNRB και FHL2, ενώ κανένα γονίδιο δεν εμπλέκεται αποκλειστικά στο αντι-αποπτωτικό μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2 ή του NFκB. Ο ID1 (7,1%) είναι το μοναδικό κοινό γονίδιο μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT, MEK1/2/ERK1/2 και NFκB, ενώ το NRG1 (7,1%) συμμετέχει στα μονοπάτια PI3K/AKT και MEK1/2/ERK1/2. Κανένα γονίδιο δεν είναι κοινό μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT και NFκB καθώς και μεταξύ των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2 και NFκB.

Πίνακας 4.5: Πίνακας με τα 4 μονοπάτια απόπτωσης και τα 3 μονοπάτια επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικά μονοπάτια των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-apoE3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS. Για κάθε ένα μονοπάτι παρουσιάζονται τα αλλαγμένα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτό εκ του συνόλου των 33 αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων που σχετίζονται με την απόπτωση ή/και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα γονίδια κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση το λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC, όπως προέκυψε από τις μικροσυστοιχίες.

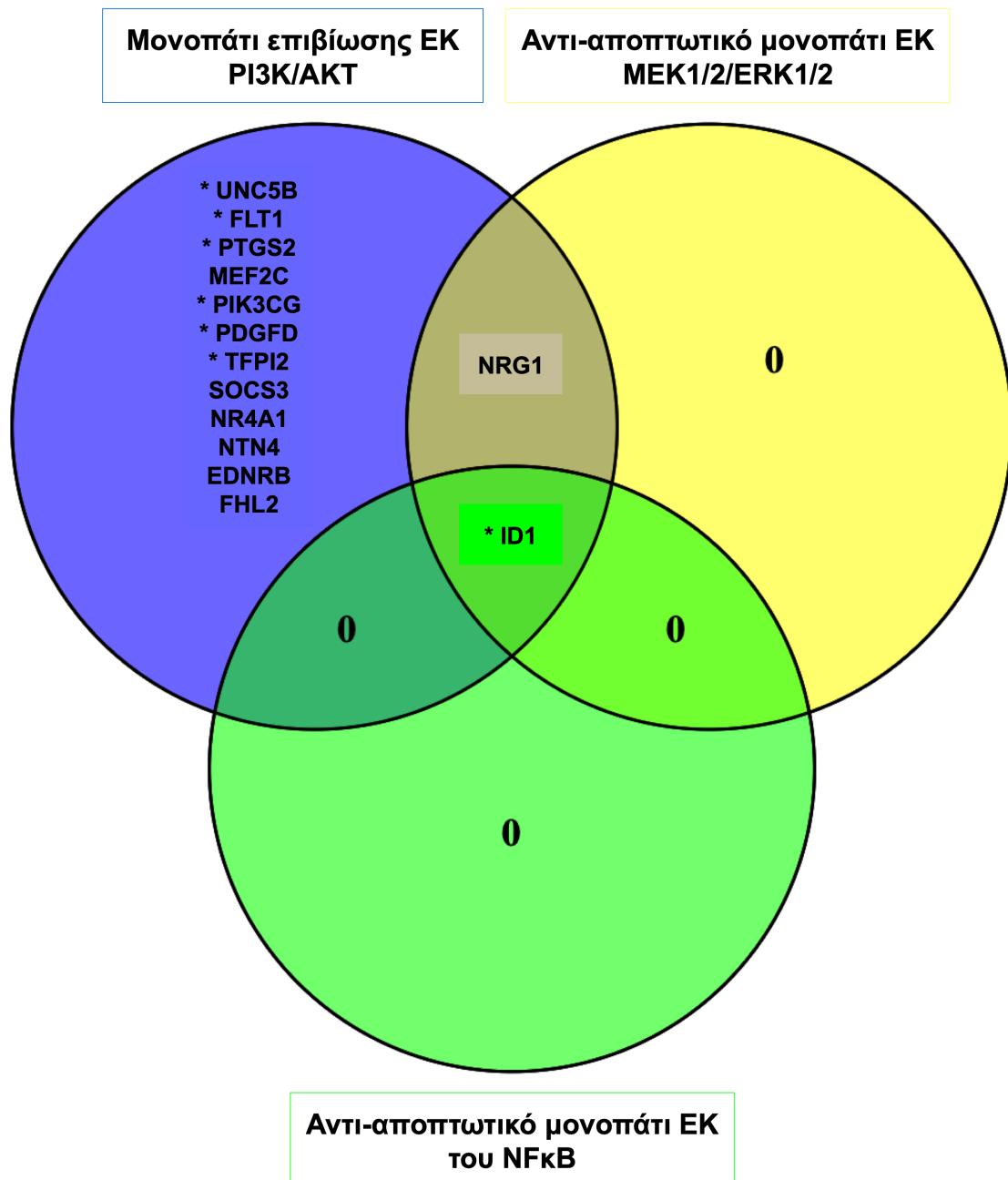
| | | Μονοπάτια απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (26 γονίδια) | | | | Μονοπάτια επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικά μονοπάτια των ενδοθηλιακών κυττάρων (14 γονίδια) | | |
|--|---|---|---|--|--|---|---|--|
| Γονίδια σχετιζόμενα με απόπτωση ή/και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (33 γονίδια) | Λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC (μικροσυστοιχίες) | Αποπτωτικό μονοπάτι του cytoC (17 γονίδια) | Αποπτωτικό μονοπάτι των p38 MAPK ή/και JNK κινασών (5 γονίδια) | Αποπτωτικό μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου (4 γονίδια) | Αποπτωτικό μονοπάτι του P53 (3 γονίδια) | Μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT (14 γονίδια) | Αντι-αποπτωτικό μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2 (2 γονίδια) | Αντι-αποπτωτικό μονοπάτι του NFκB (1 γονίδιο) |
| ANGPTL4 | 5,281 | ✓ | | | | | | |
| ADAMTS1 | 3,757 | ✓ | | ✓ | | | | |
| UNC5B | 3,570 | | | | ✓ | ✓ | | |
| SNAI1 | 3,163 | ✓ | | | | | | |
| FLT1 | 2,768 | | | | | ✓ | | |
| RGS5 | 2,702 | | ✓ | | | | | |
| ID1 | 2,522 | ✓ | | | | ✓ | ✓ | ✓ |

| | | | | | | | | |
|--------|--------|---|---|---|---|---|---|--|
| HES1 | 2,440 | | | ✓ | | | | |
| PTGS2 | 2,436 | ✓ | | | | ✓ | | |
| MEF2C | 2,433 | | | | | ✓ | | |
| VIPR1 | 2,424 | ✓ | | | | | | |
| EGR1 | 2,363 | | | ✓ | | | | |
| PIK3CG | 2,238 | | | ✓ | | ✓ | | |
| PDGFD | 2,207 | | | | | ✓ | | |
| TFPI2 | 2,166 | | | | | ✓ | | |
| COL4A1 | 2,139 | ✓ | | | | | | |
| SOCS3 | 2,094 | ✓ | | | | ✓ | | |
| NR4A1 | 2,047 | | | | | ✓ | | |
| DLL4 | 2,047 | ✓ | | | | | | |
| TGM2 | -2,000 | | | | ✓ | | | |
| NTN4 | -2,053 | | | | | ✓ | | |
| EDNRB | -2,063 | ✓ | | | | ✓ | | |
| PRKAA2 | -2,073 | ✓ | ✓ | | | | | |
| FHL2 | -2,127 | | | | | ✓ | | |
| MAP3K5 | -2,147 | | ✓ | | | | | |
| PTGIR | -2,212 | ✓ | | | | | | |
| PTGIS | -2,284 | ✓ | | | | | | |
| AQP1 | -2,352 | ✓ | | | | | | |
| NRG1 | -2,390 | ✓ | | | | ✓ | ✓ | |
| UCP2 | -2,722 | ✓ | ✓ | | | | | |
| DKK1 | -3,649 | | ✓ | | | | | |
| NUPR1 | -4,361 | | | | ✓ | | | |
| IL8 | -4,411 | ✓ | | | | | | |



Εικόνα 4.18: Διάγραμμα Venn (Venny 2.1.0 - BioinfoGP - CSIC) στο οποίο παρουσιάζονται τα 26 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 που συμμετέχουν σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (EK): 1) Μιτοχονδριακό μονοπάτι απόπτωσης του κυτοχρώματος C (cytoC) (17 γονίδια), 2) μονοπατι απόπτωσης των p38 MAPK ή/και JNK κινασών (5 γονίδια), 3) μονοπάτι απόπτωσης των υποδοχέων θανάτου (4 γονίδια) και 4) μονοπάτι απόπτωσης του P53 (3 γονίδια). Στο διάγραμμα Venn απεικονίζονται τα κοινά γονίδια μεταξύ δύο ή περισσότερων μονοπατιών απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Ο αστερίσκος (*) επισημαίνει τα 16 γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία αναλύθηκαν με

qRT-PCR στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 και επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφρασή τους (Ενότητα 4.7, Πίνακας 4.7).



Εικόνα 4.19: Διάγραμμα Venn (Venny 2.1.0 - BioinfoGP - CSIC) στο οποίο παρουσιάζονται τα 14 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 που συμμετέχουν σε ένα ή περισσότερα από τα εξής σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικά μονοπάτια των ενδοθηλιακών κυττάρων (EK): 1) Μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT (14 γονίδια), 2) αντι-αποπτωτικό μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2 (2 γονίδια) και 3) αντι-αποπτωτικό μονοπάτι του NFκB (1 γονίδιο). Στο διάγραμμα Venn απεικονίζονται τα κοινά γονίδια μεταξύ δύο ή περισσότερων μονοπατιών επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικά μονοπάτια

των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα, καθώς και τα μοναδικά γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε ένα μονοπάτι. Ο αστερίσκος (*) επισημαίνει τα 7 γονίδια που σχετίζονται με την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία αναλύθηκαν με qRT-PCR στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 και επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφρασή τους (Ενότητα 4.7, Πίνακας 4.7).

4.6.6. Μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα

Με βάση την ανάλυση γονιδίων μέσω PubMed για τη λειτουργία “Κυτταρικός Κύκλος” προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 επάγει αλλαγές έκφρασης σε 9 γονίδια (5 υπερεκφράζονται και 4 υποεκφράζονται) ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου στα HAEC κύτταρα, τα οποία ελέγχουν την έκφραση ή/και την ενεργοποίηση κεντρικών μορίων-ρυθμιστών (Πίνακας 4.6): 1) της μεταβατικής φάσης G1/S (6 γονίδια: 4 υπερεκφράζονται και 2 υποεκφράζονται) του κυτταρικού κύκλου στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών ρύθμισης της G1/S μετάβασης CDKN1A (P21CIP1), CDKN2A (P16INK4A) και CDKN1B (P27KIP1), οι κυκλίνες D1 (CCND1) και E1 (CCNE1), το ρετινοβλάστωμα (RB) και ο μεταγραφικός παράγοντας E2F, και 2) της μεταβατικής φάσης G2/M (6 γονίδια: 3 υπερεκφράζονται και 3 υποεκφράζονται) του κυτταρικού κύκλου στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών ρύθμισης της G2/M μετάβασης CDKN1A (P21CIP1) και CDKN1C (P57KIP2). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην έκφραση των προαναφερόμενων κεντρικών μορίων-ρυθμιστών της μεταβατικής φάσης G1/S και G2/M στα HAEC κύτταρα που επώαστηκαν με την rHDL-apoE3. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι η αλλαγή στην έκφραση των μορίων αυτών μπορεί να είναι χαμηλότερη από τα αυστηρά κριτήρια ($FC \geq \pm 2,00$ και $FDR \leq 0,05$) που εφαρμόστηκαν στη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών ή η αλλαγή αυτή να αναμένεται σε μεταγενέστερη χρονική στιγμή επώασης.

Πίνακας 4.6: Πίνακας με τα 9 αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS τα οποία ρυθμίζουν τη μεταβατική φάση G1/S ή/και τη G2/M του κυτταρικού κύκλου στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα γονίδια κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση το λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC, όπως προέκυψε από τις μικροσυστοιχίες.

| Γονίδια ρύθμισης κυτταρικού κύκλου στα ενδοθηλιακά κύτταρα (9 γονίδια) | Λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC (μικροσυστοιχίες) | Μεταβατική φάση G1/S (6 γονίδια) | Μεταβατική φάση G2/M (6 γονίδια) |
|--|--|----------------------------------|----------------------------------|
| ID1 | 2,522 | ✓ | ✓ |
| HES1 | 2,440 | ✓ | |
| EGR1 | 2,363 | | ✓ |
| DLL4 | 2,047 | ✓ | ✓ |
| NR4A1 | 2,047 | ✓ | |
| TGM2 | -2,000 | ✓ | ✓ |
| CDK1 | -2,100 | | ✓ |
| HMMR | -2,124 | | ✓ |
| TGFB2 | -2,741 | ✓ | |

4.7. Πειράματα επιβεβαίωσης των μετρήσεων των μικροσυστοιχιών με qRT-PCR

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι αλλαγές έκφρασης που παρατηρήθηκαν με τις μικροσυστοιχίες σε 31 επιλεγμένα γονίδια-κλειδιά (17 υπερεκφράστηκαν και 14 υποεκφράστηκαν) (Πίνακας 4.7), τα οποία σχετίζονται με τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό ή/και τη διαφοροποίηση και την απόπτωση ή/και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, εφαρμόστηκαν αναλύσεις μεγάλης κλίμακας ποσοτικής RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) σε HAEC κύτταρα μετά από επώαση (12h) με rHDL-αροΕ3 (250 μg/ml). Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν HAEC κύτταρα που εκτέθηκαν (12h) σε PBS (Ενότητα 3.20). Η επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων βασίστηκε στο σημαντικό τους ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης (25 γονίδια), πολλαπλασιασμού (24 γονίδια), διαφοροποίησης (17 γονίδια), απόπτωσης (16 γονίδια) και επιβίωσης (7 γονίδια) των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα (Ενότητα 4.6.2) (Πίνακες 4.2-4.5) (Εικόνες 4.20-4.33). Ειδικότερα, τα 25 από τα 31 εξεταζόμενα γονίδια συμμετέχουν στα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, των RHO-GTPασών και των ιντεγκρινών των

HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο, τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω και χαρακτηρίστηκαν σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης και ενεργοποίησης και σε λειτουργικό επίπεδο (Ενότητες 4.8-4.10, 4.13.2-4.13.4). Επιπλέον, 14 από τα 31 αυτά γονίδια ήταν μεταξύ των 30 μεταγράφων που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες αλλαγές έκφρασης (υπερέκφραση και υποέκφραση) στα πειράματα των μικροσυστοιχιών (Πίνακας 1-Παράρτημα).

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων qRT-PCR ήταν σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα ευρήματα των μικροσυστοιχιών. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων qRT-PCR και μικροσυστοιχιών για τα 31 υπό μελέτη μετάγραφα προέκυψε μία ισχυρή θετική συσχέτιση (συντελεστής συσχέτισης Pearson, $r = 0,81$). Οι αλλαγές έκφρασης που προκάλεσε η rHDL-αροΕ3 στα HAEC κύτταρα επιβεβαιώθηκαν για τα 29 εκ του συνόλου των 31 μεταγράφων που αναλύθηκαν με qRT-PCR (χρησιμοποιώντας ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το $P \leq 0,05$), με εξαίρεση τα TGFB2 και ITGB8 (Πίνακας 4.7). Ειδικότερα, ο λόγος αλλαγής έκφρασης του TGFB2 και της ITGB8 που υπολογίστηκε από την qRT-PCR ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο λόγο που προέκυψε από τις μικροσυστοιχίες, αλλά η παρατηρούμενη μείωση της έκφρασής τους στην ανάλυση με qRT-PCR ήταν μη στατιστικώς σημαντική ($P > 0,05$) (Πίνακας 4.7). Ως εκ τούτου, τα γονίδια αυτά δε μελετήθηκαν περαιτέρω σε πρωτεϊνικό και λειτουργικό επίπεδο. Ο λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης κατά απόλυτη τιμή που υπολογίστηκε από τις αναλύσεις με qRT-PCR ήταν μεγαλύτερος για τα 25 από τα 31 εξεταζόμενα μετάγραφα από τον αντίστοιχο λόγο που προέκυψε από τις μικροσυστοιχίες. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα PRKAA2, AQP1, ANXA3, CXCL11, TGFB2 και FST (Πίνακας 4.7). Η διαφορά αυτή είναι ευρέως αποδεκτή στην επιστημονική βιβλιογραφία και οφείλεται στη μεγαλύτερη ευαισθησία της τεχνικής qRT-PCR συγκριτικά με τις μικροσυστοιχίες, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση μικρότερων αλλαγών γονιδιακής έκφρασης [480-482].

Συμπερασματικά, οι μετρήσεις των μικροσυστοιχιών επιβεβαιώθηκαν με τις αναλύσεις qRT-PCR για τα 29 υπό μελέτη μετάγραφα με βασικό ρόλο στα μονοπάτια μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.

Στις Εικόνες 4.20-4.23 αναπαριστώνται διαγραμματικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, των RHO-GTPασών και των ιντεγκρινών των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που επιβεβαιώθηκαν με qRT-PCR (24 συνολικά γονίδια). Οι αλλαγές γονιδιακής έκφρασης που επάγει η rHDL-αροΕ3 στα τέσσερα

μονοπάτια μετανάστευσης των HAEC κυττάρων επιβεβαιώθηκαν σε μεταγραφικό επίπεδο. Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων παίζει κρίσιμο ρόλο στα πρώιμα στάδια της αποκατάστασης του τραυματισμένου ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος και στην προστασία της ενδοθηλιακής ακεραιότητας και λειτουργικότητας, συμβάλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ή ακόμη και στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης [206, 207] [212] [215]. Επιπλέον, η συγκεκριμένη λειτουργία εμφάνισε τις περισσότερες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-αροΕ3 (Πίνακες 4.1-4.2) (Εικόνα 4.10). Για τους λόγους αυτούς, η παρούσα μελέτη εστιάστηκε περαιτέρω στο χαρακτηρισμό των μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε πρωτεϊνικό και λειτουργικό επίπεδο και σε βαθμό ενεργοποίησης (Ενότητες 4.8-4.10, 4.13.2-4.13.4).

Στις Εικόνες 4.24-4.26 αναπαριστώνται διαγραμματικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT και των ιντεγκρινών των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που επιβεβαιώθηκαν με qRT-PCR (22 συνολικά γονίδια).

Στις Εικόνες 4.27-4.29 αναπαριστώνται διαγραμματικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια διαφοροποίησης PI3K/AKT/eNOS, MEK1/2/ERK1/2 και των ιντεγκρινών των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που επιβεβαιώθηκαν με qRT-PCR (17 συνολικά γονίδια).

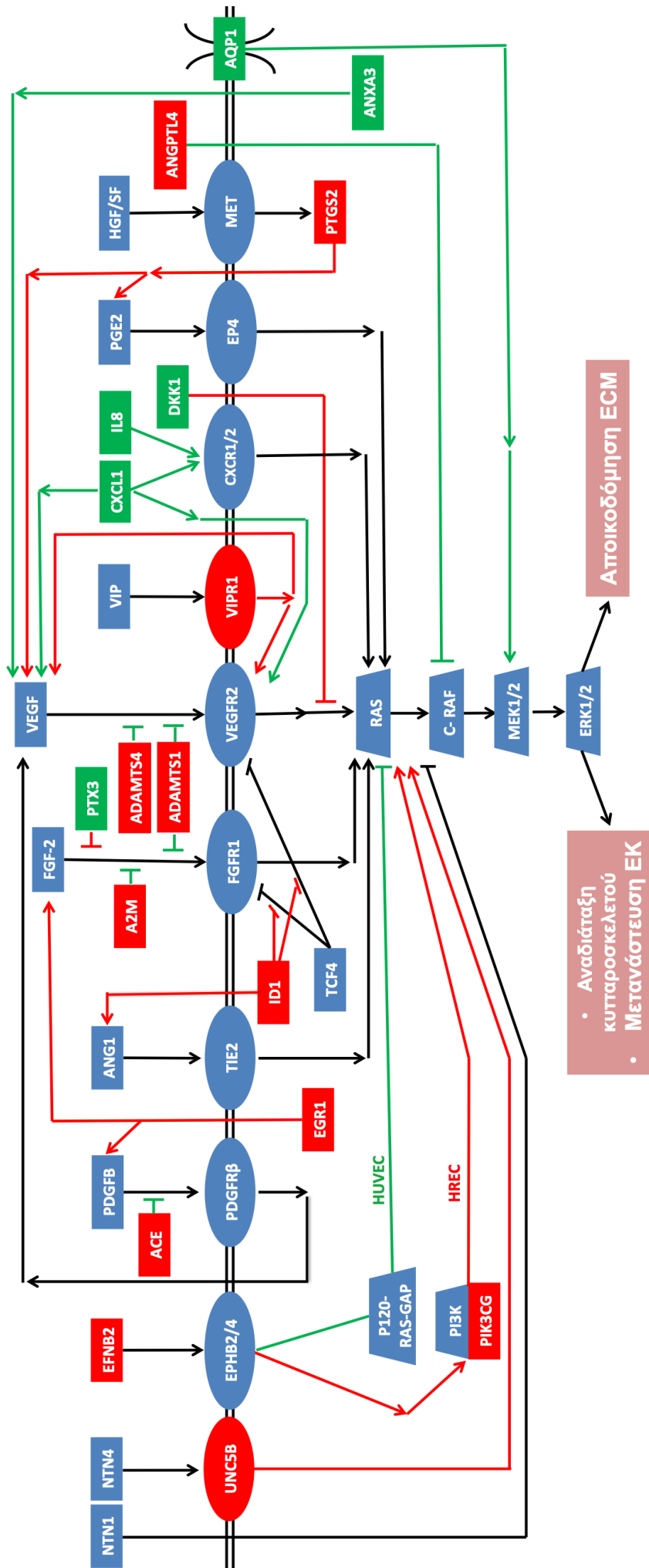
Στις Εικόνες 4.30-4.32 αναπαριστώνται διαγραμματικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης του cytoC, των υποδοχέων θανάτου και του P53 των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο, στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που επιβεβαιώθηκαν με qRT-PCR (15 συνολικά γονίδια). Το αποπτωτικό μονοπάτι των κινασών p38 MAPK ή/και JNK δεν αναπαριστάται διαγραμματικά καθώς από τα πέντε γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό μόνο δύο αναλύθηκαν με qRT-PCR, τα οποία και επιβεβαιώθηκαν.

Στην Εικόνα 4.33 αναπαριστάται διαγραμματικά το σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα, στο οποίο συμμετέχουν τα γονίδια που επιβεβαιώθηκαν με qRT-PCR (7 γονίδια). Τα αντι-αποπτωτικά μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2 και NFκB δεν αναπαριστώνται

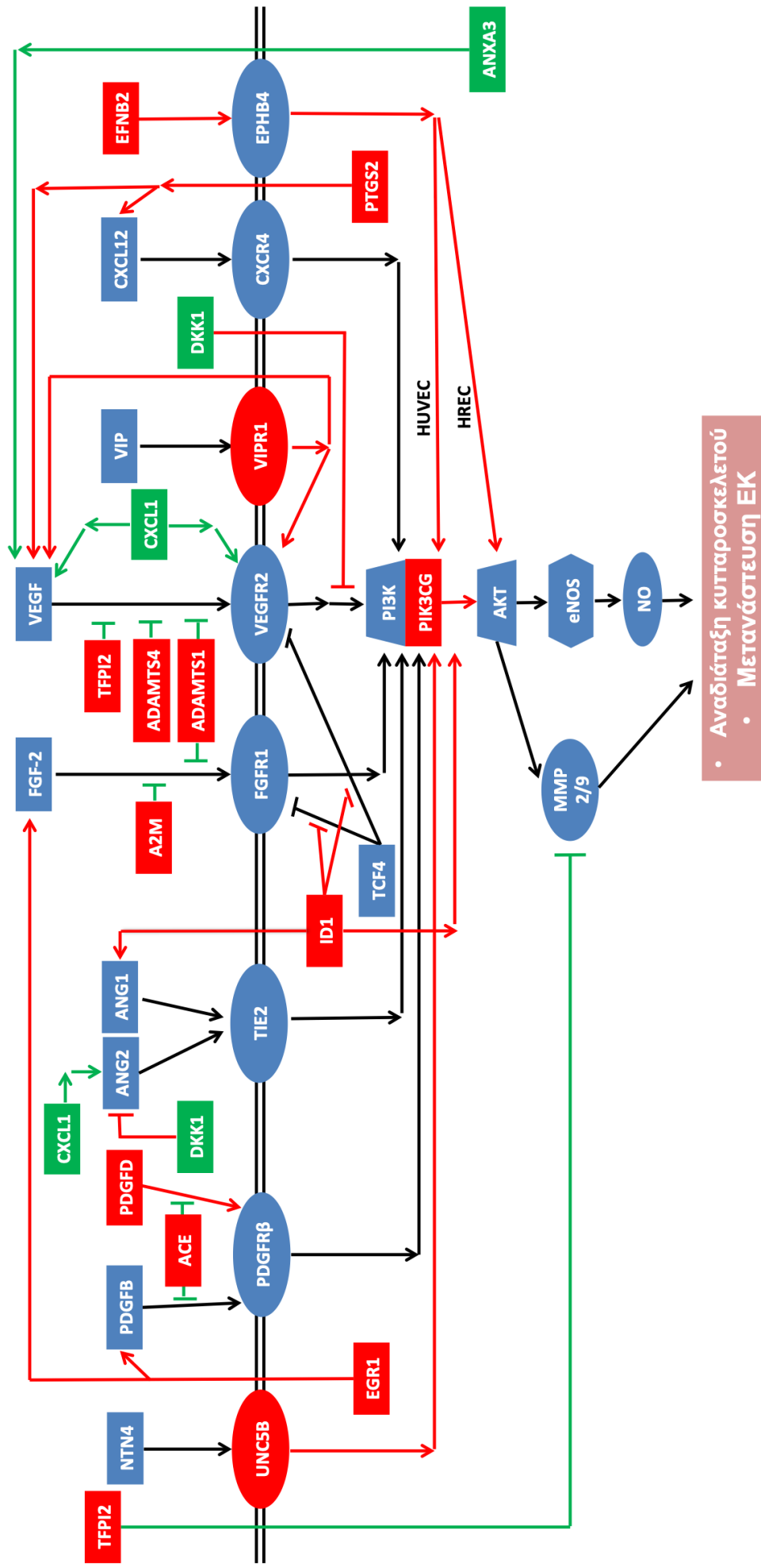
διαγραμματικά καθώς ένα μόνο γονίδιο που εμπλέκεται στο κάθε ένα μονοπάτι αναλύθηκε με qRT-PCR, το οποίο και επιβεβαιώθηκε.

Πίνακας 4.7: Μελέτη των αλλαγών έκφρασης με qRT-PCR σε 31 επιλεγμένα μετάγραφα με βασικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επιβίωσης των HAEC κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $P \leq 0,05$. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων qRT-PCR επιβεβαίωσαν τις μετρήσεις των μικροσυστοιχιών για τα 29/31 μετάγραφα, με εξαίρεση τα TGFB2 και ITGB8 (ns: μη στατιστικώς σημαντική αλλαγή γονιδιακής έκφρασης, $P > 0,05$). Ο λόγος αλλαγής έκφρασης για το εκάστοτε μετάγραφο ορίζεται ο λόγος της μέσης έκφρασης ενός γονιδίου μετά από έκθεση σε rHDL-αροΕ3 προς την έκφρασή του μετά από χορήγηση PBS ($n = 5$ βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία). Τα γονίδια κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση το λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC, όπως προέκυψε από τις μικροσυστοιχίες.

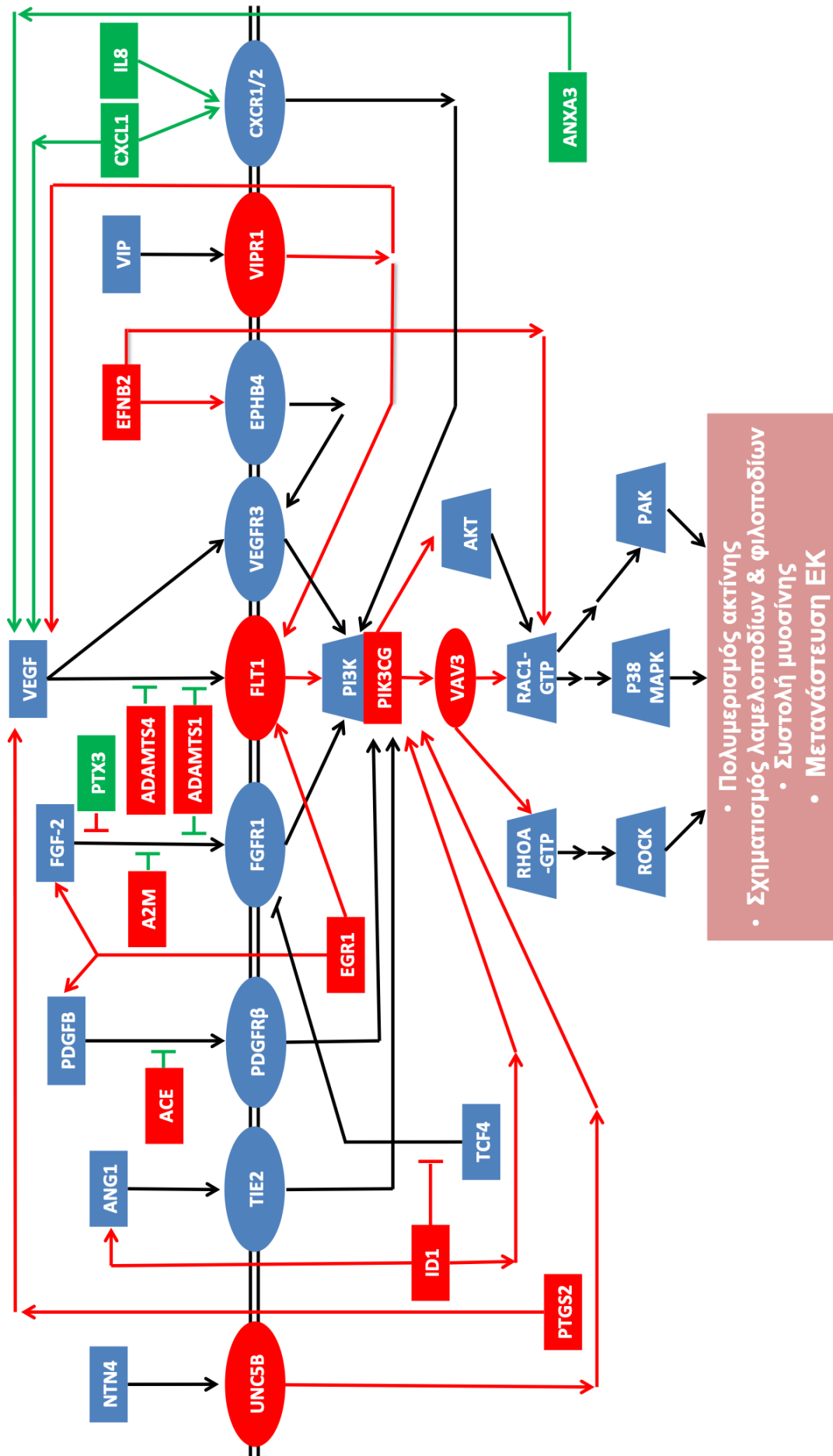
| Γονίδια μετανάστευσης, πολλαπ/σμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης & επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων (31 γονίδια) | Μικροσυ- στοιχίες Λόγος αλλαγής γονιδια- κής έκφρασης FC | qRT-PCR Λόγος αλλαγής γονιδια- κής έκφρασης FC | Συμμετοχή στα μονοπάτια μετανά- στευσης των ενδοθηλ. κυττάρων (25 γονίδια) | Συμμετοχή στα μονοπάτια πολλαπλα- σιασμού των ενδοθηλ. κυττάρων (24 γονίδια) | Συμμετοχή στα μονοπάτια διαφορο- ποίησης των ενδοθηλ. κυττάρων (17 γονίδια) | Συμμετοχή στα μονοπάτια απόπτω- σης των ενδοθηλ. κυττάρων (16 γονίδια) | Συμμετοχή στα μονοπάτια επιβίωσης των ενδοθηλ. κυττάρων (7 γονίδια) |
|--|---|--|---|---|--|--|--|
| ANGPTL4 | 5,281 | 9,141 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| ADAMTS4 | 5,099 | 9,088 | ✓ | | | | |
| VAV3 | 3,787 | 5,945 | ✓ | | | | |
| ADAMTS1 | 3,757 | 4,156 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| UNC5B | 3,570 | 9,899 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| EFNB2 | 3,032 | 3,654 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| FLT1 | 2,768 | 4,027 | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| ID1 | 2,522 | 3,090 | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ |
| A2M | 2,493 | 2,619 | ✓ | ✓ | | | |
| ACE | 2,452 | 3,221 | ✓ | | | | |
| PTGS2 | 2,436 | 3,140 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| VIPR1 | 2,424 | 3,859 | ✓ | ✓ | | ✓ | |
| EGR1 | 2,363 | 5,889 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| PIK3CG | 2,238 | 3,372 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| PDGFD | 2,207 | 2,428 | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| TFPI2 | 2,166 | 2,945 | ✓ | ✓ | | | ✓ |
| COL4A1 | 2,139 | 2,247 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| PRKAA2 | -2,073 | -1,923 | | | | ✓ | |
| PTGIR | -2,212 | -2,469 | ✓ | ✓ | | ✓ | |
| PTGIS | -2,284 | -2,398 | | ✓ | | ✓ | |
| AQP1 | -2,352 | -2,278 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| ANXA3 | -2,441 | -2,000 | ✓ | | ✓ | | |
| CXCL11 | -2,531 | -1,678 | | ✓ | | | |
| TGFB2 | -2,741 | -2,092 (ns) | ✓ | ✓ | | | |
| FST | -2,785 | -2,079 | | | ✓ | | |
| ITGB8 | -3,174 | -3,289 (ns) | | ✓ | | | |
| DKK1 | -3,649 | -5,714 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| NUPR1 | -4,361 | -7,634 | | | | ✓ | |
| IL8 | -4,411 | -15,873 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| CXCL1 | -4,860 | -31,250 | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| PTX3 | -7,861 | -10,309 | ✓ | ✓ | ✓ | | |



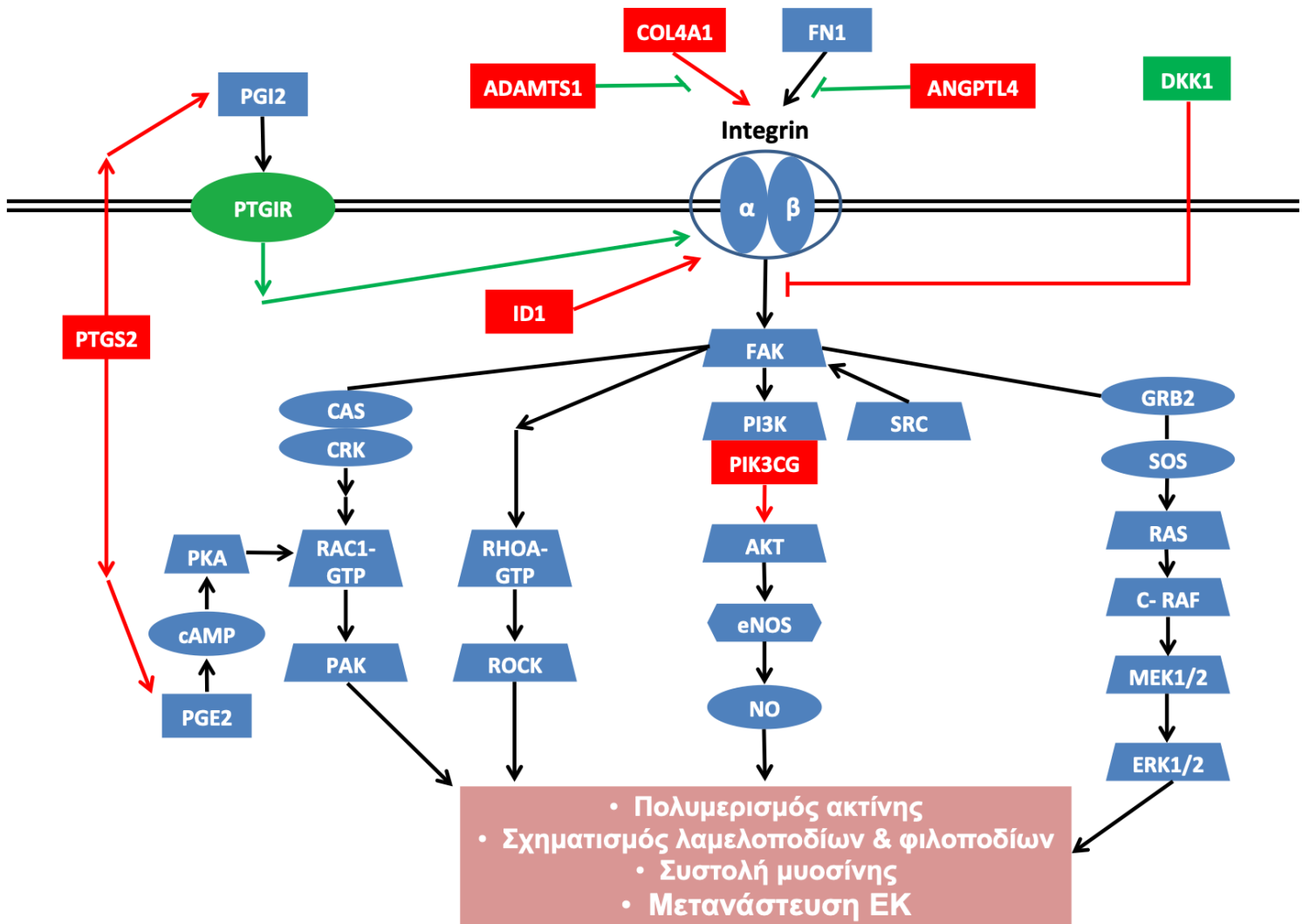
Εικόνα 4.20: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) MEK1/2/ERK1/2 που επηρεάζεται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-apoE3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 18 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών των γονιδίων του μονοπατιού υποστηρίζει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2 από την rHDL-apoE3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταροσκελετική αναδιάταξη, και επακόλουθη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ─ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης. ECM: εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix).



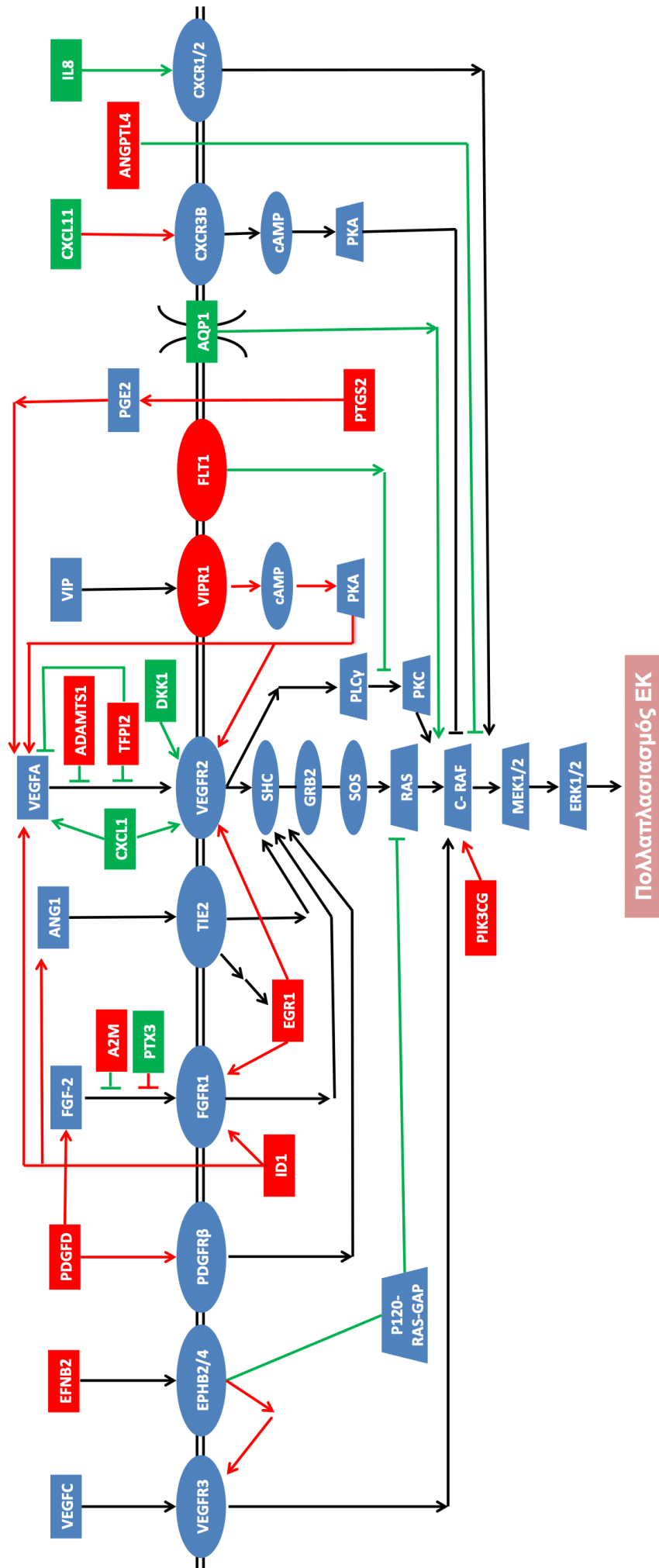
Εικόνα 4.21: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 16 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό. Η πλειοψηφία των μεταγραφικών αλλαγών των γονιδίων του μονοπατιού υποστηρίζει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση της eNOS από την rHDL-αροΕ3, ενώ ένας μικρότερος αριθμός αλλαγών προτείνει την πιθανή ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2/9. Η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών αυτών μορίων θα μπορούσε να οδηγήσει στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ⇐ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



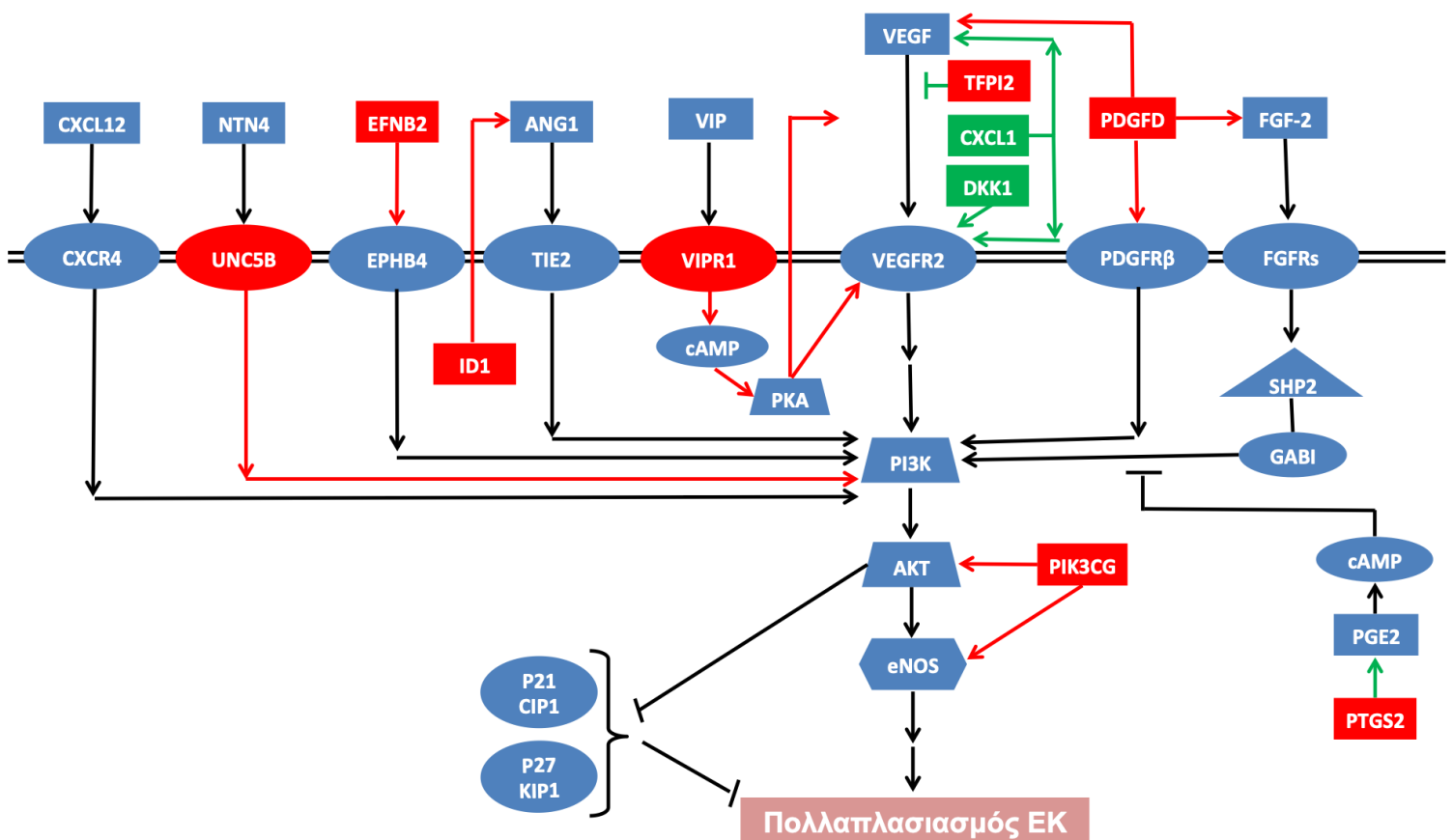
Εικόνα 4.22: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) καθοδικά των μικρών RHO-GTPασών που επηρεάζεται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-apoE3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 17 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Η πλειοψηφία των μεταγραφικών αλλαγών των γονιδίων του μονοπατιού υποστηρίζει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση της RAC1-GTPάσης από την rHDL-apoE3, ενώ ένας μικρότερος αριθμός αλλαγών προτείνει την πιθανή ενεργοποίηση της RHOA-GTPάσης. Η ενεργοποίηση των RAC1- και RHOA-GTPασών θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης και επακόλουθη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω καθοδικής ενεργοποίησης των κινασών p38 MAPK, PAK και ROCK αντίστοιχα. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). ➔ : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ⇩ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



Εικόνα 4.23: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) καθοδικά των ιντεγκρινών που επηρεάζεται από την rHDL-αρoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αρoE3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 8 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών των γονιδίων του μονοπατιού υποστηρίζει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού από την rHDL-αρoE3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταροσκελετική αναδιάταξη και επακόλουθη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). ➔ : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ┐ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.

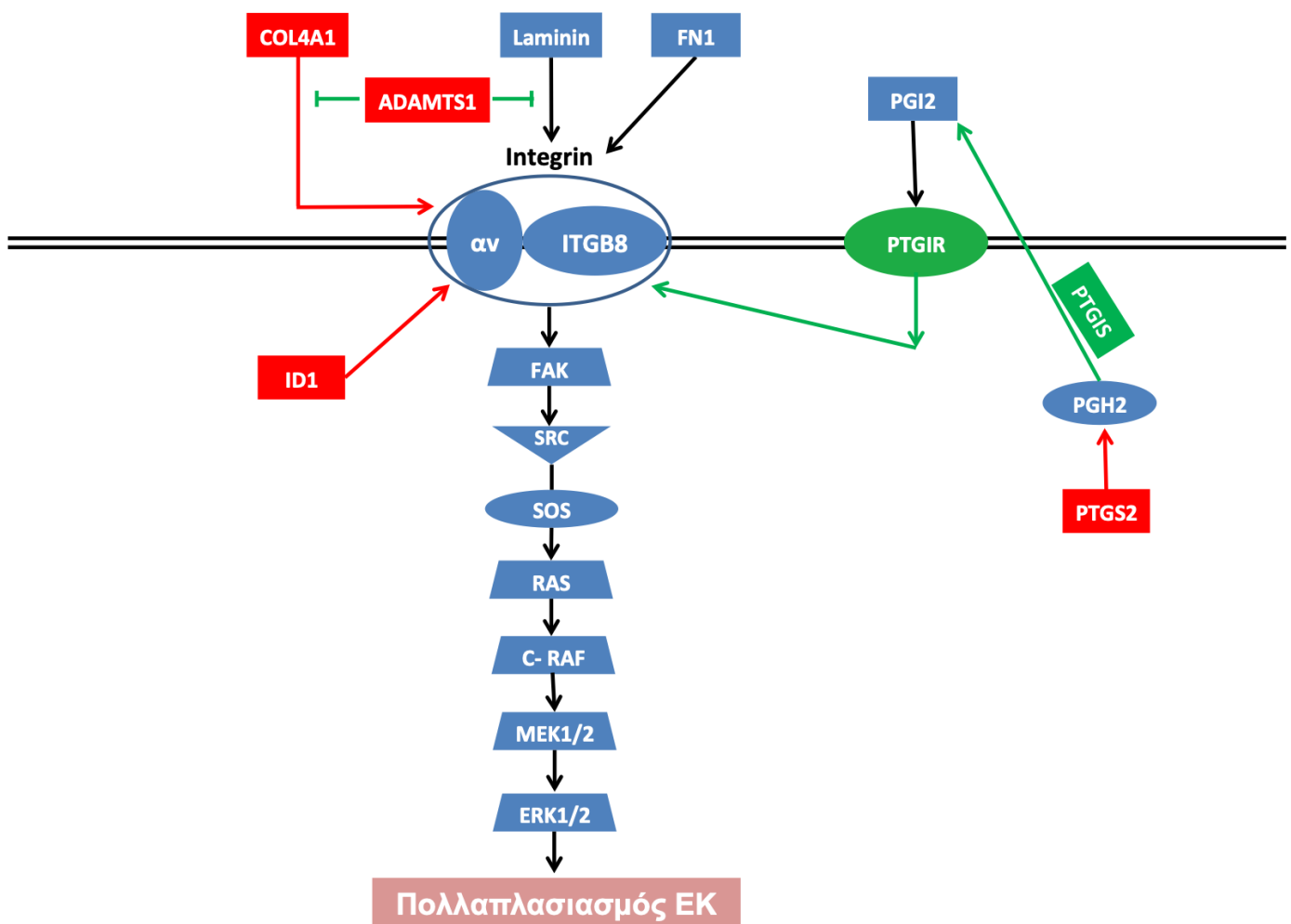


Εικόνα 4.24: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) MEK1/2/ERK1/2 που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 18 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών υποστηρίζει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση των ERK1/2 κινασών από την rHDL-αροΕ3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ⇐ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



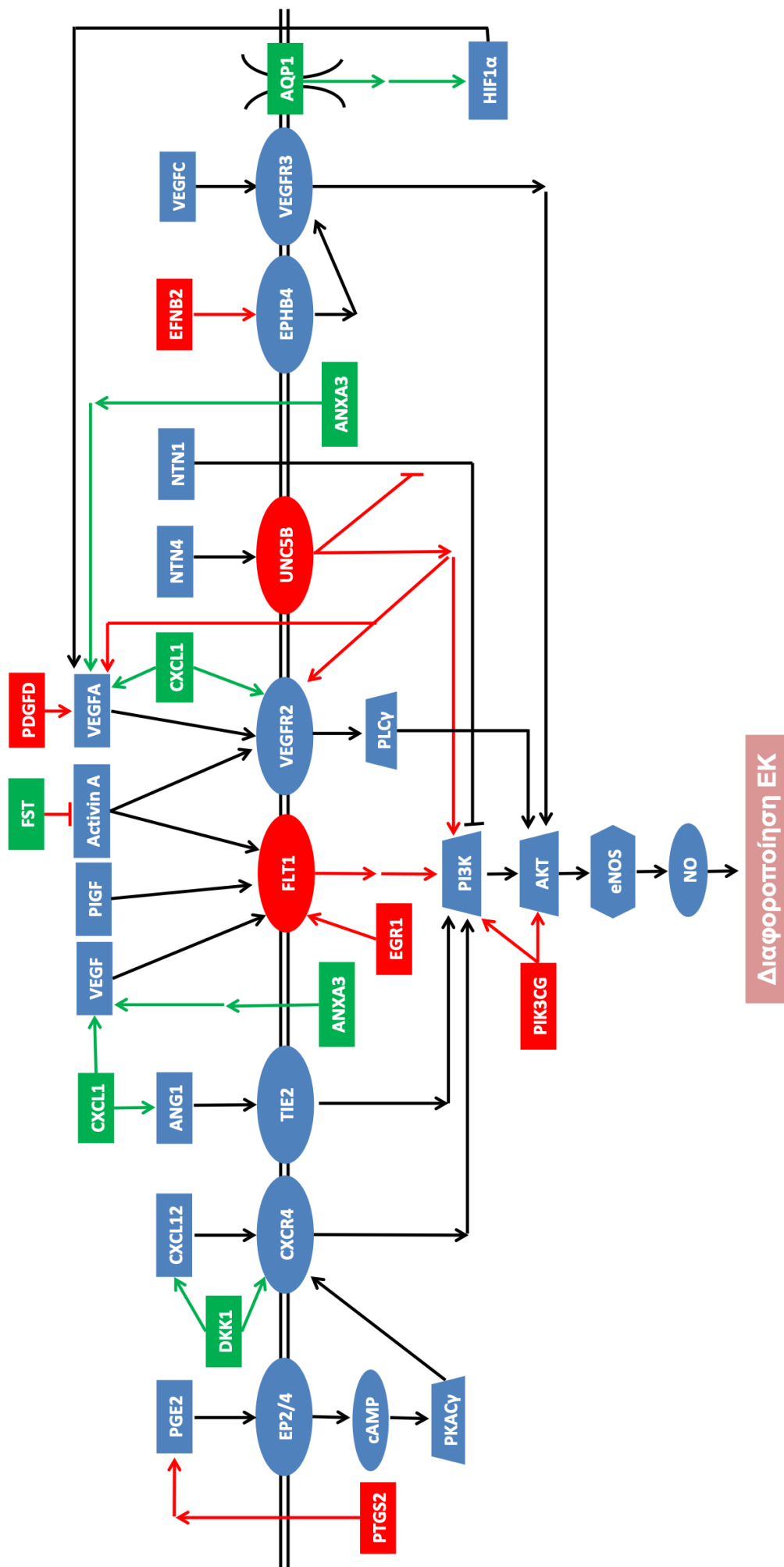
Εικόνα 4.25: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) PI3K/AKT που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές

έκφρασης σε 10 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών προτείνει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση των κινασών PI3K και AKT από την rHDL-αροΕ3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω καθοδικής ενεργοποίησης της eNOS ή επακόλουθης μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης /απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ⊣ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.

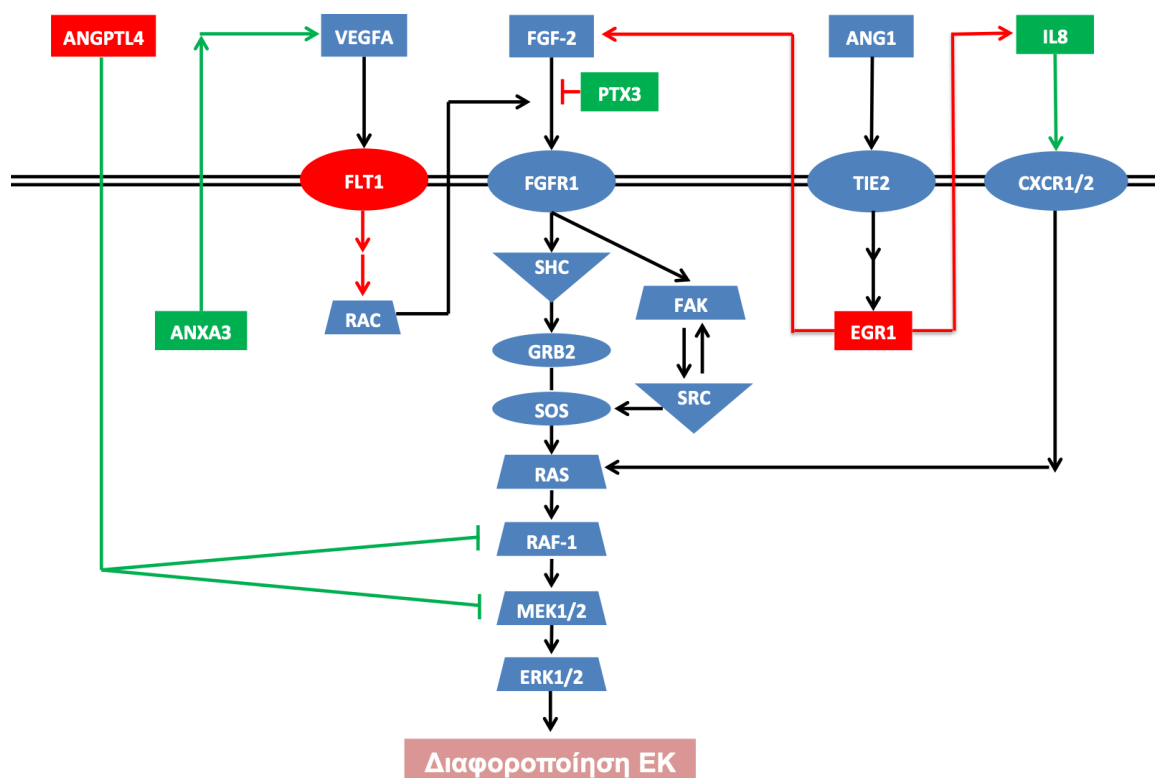


Εικόνα 4.26: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) καθοδικά των ιντεγκρινών που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR)

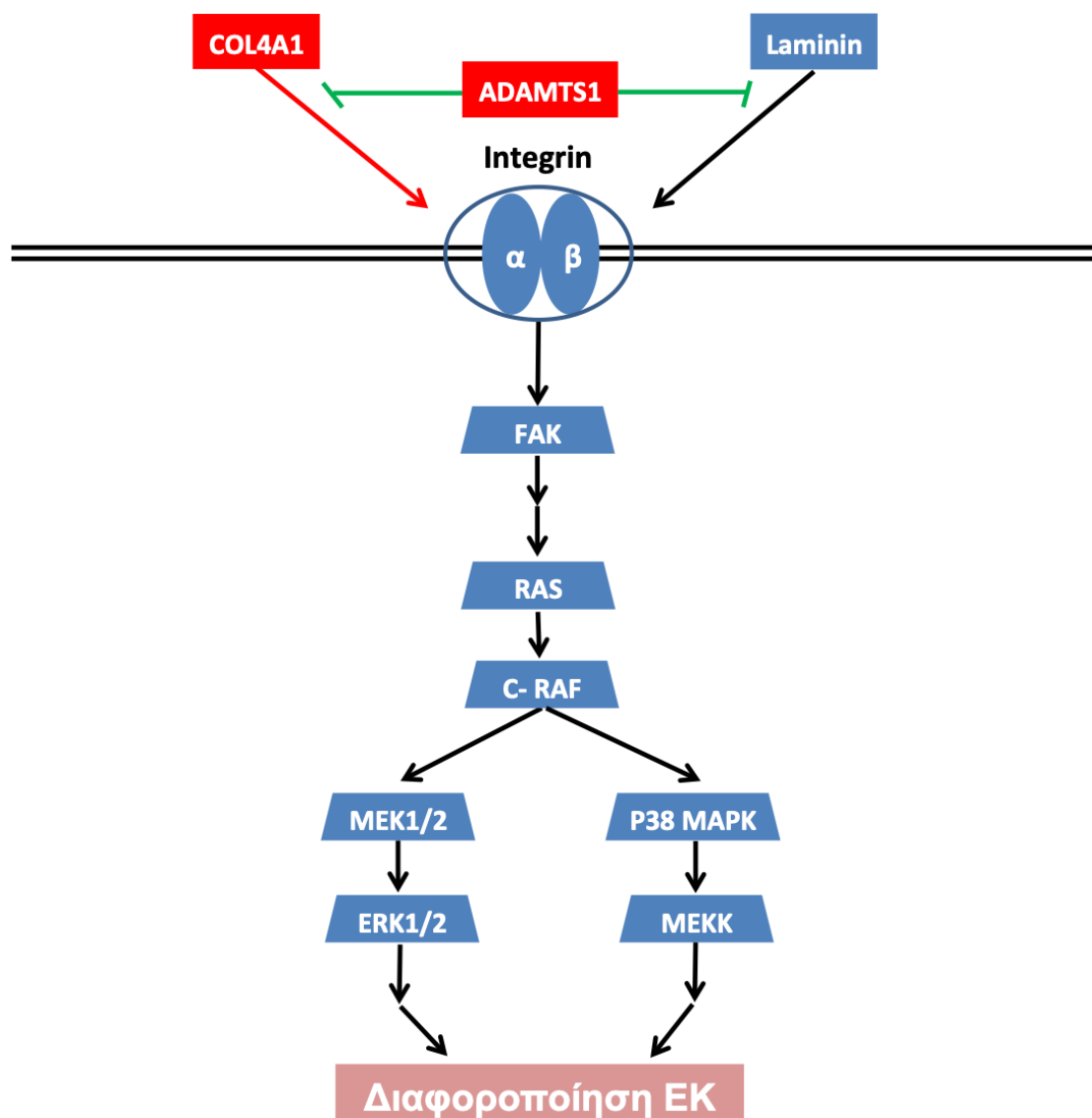
αλλαγές έκφρασης σε 6 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών υποστηρίζει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2 καθοδικά των ιντεγκρινών από την rHDL-αροΕ3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης /απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ⇩ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



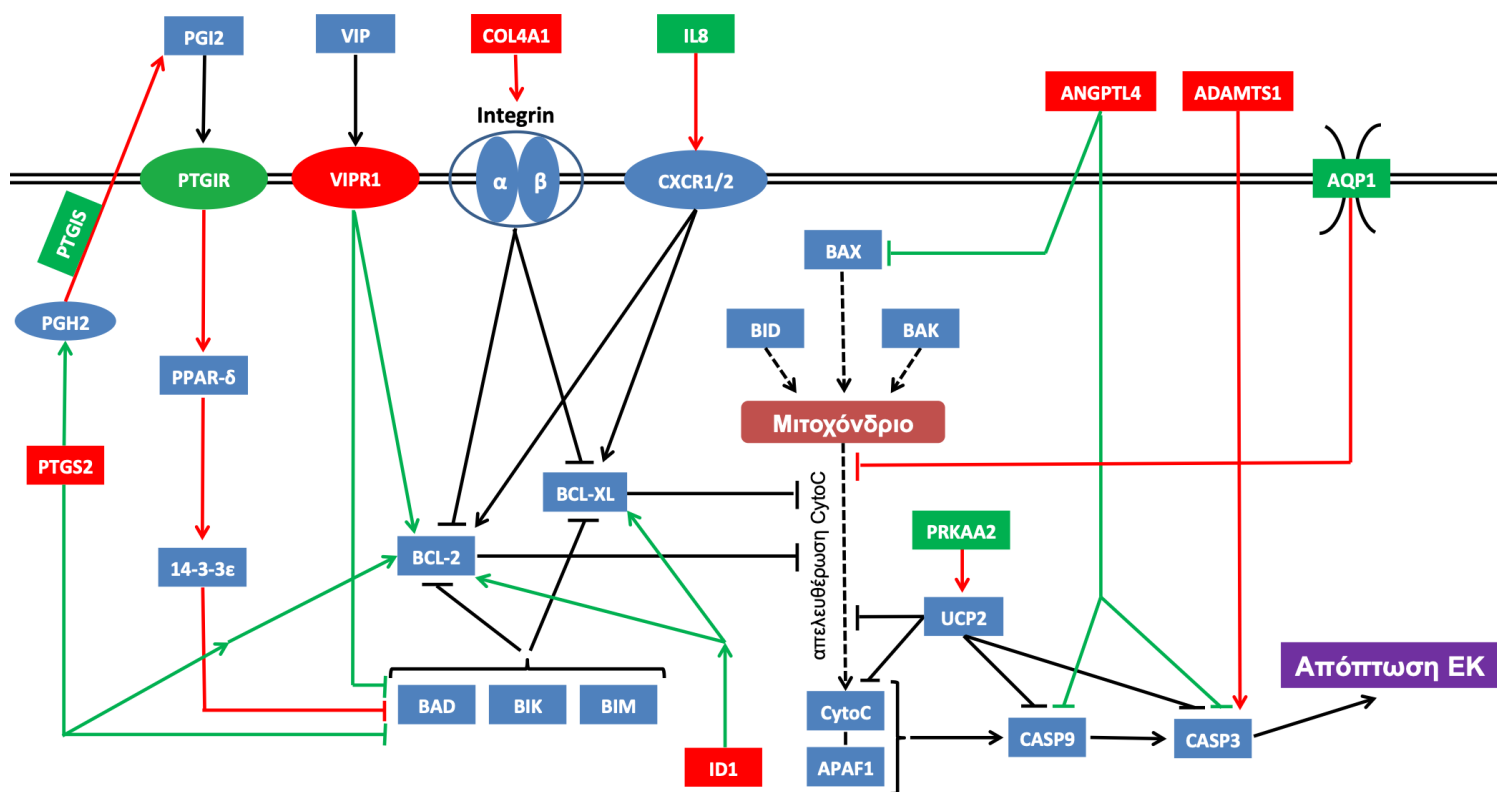
Εικόνα 4.27: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) PI3K/AKT/eNOS που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 12 γονίδια στα ΗΑΕC κύτταρα που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ┐ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



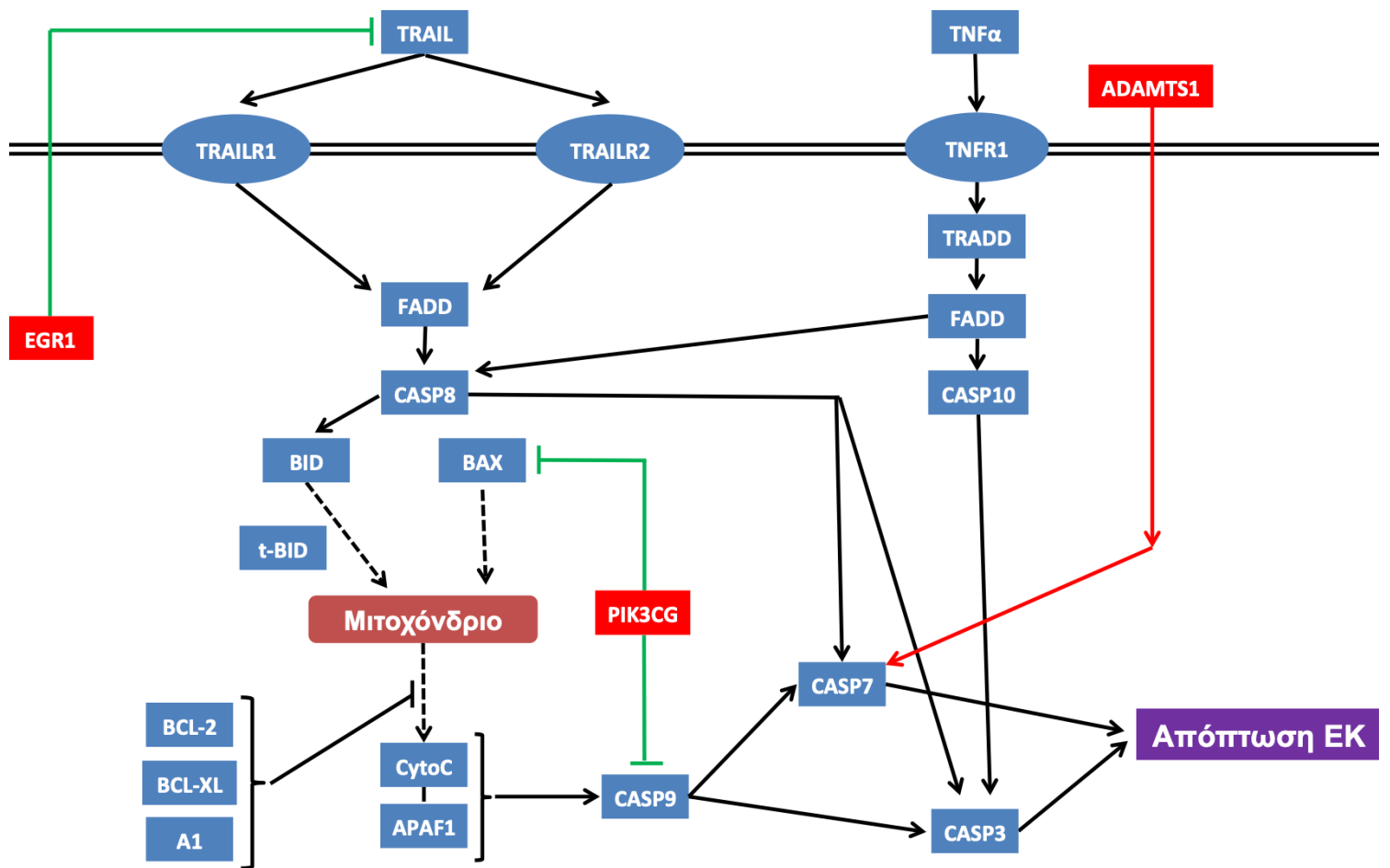
Εικόνα 4.28: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) MEK1/2/ERK1/2 που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 6 γονίδια στα ΗΑΕC κύτταρα που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ┐ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



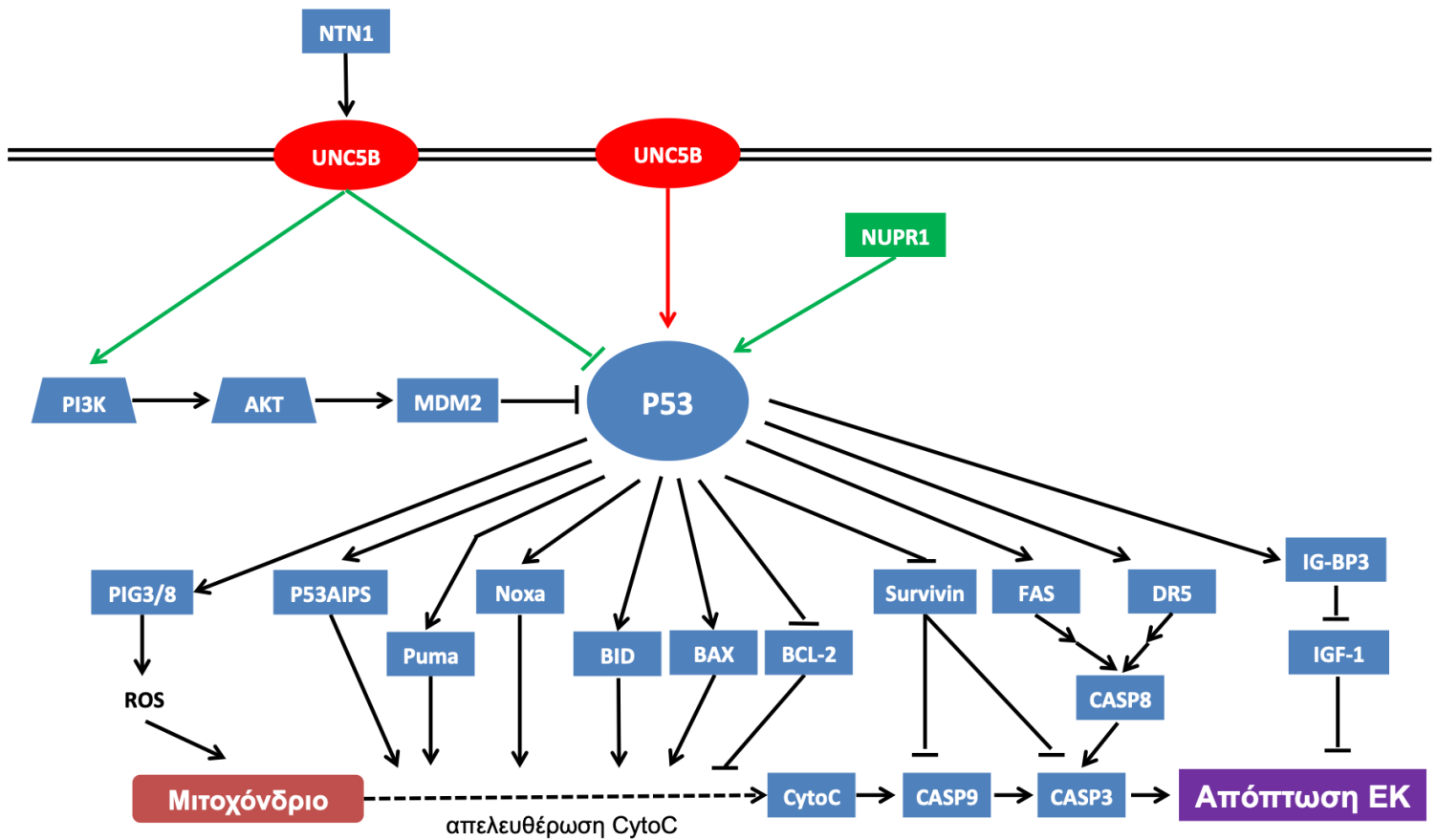
Εικόνα 4.29: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) καθοδικά των ιντεγκρινών που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης (υπερέκφραση) σε 2 γονίδια στα ΗΑΕC κύτταρα που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό. Κόκκινο: υπερέκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ⊣ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



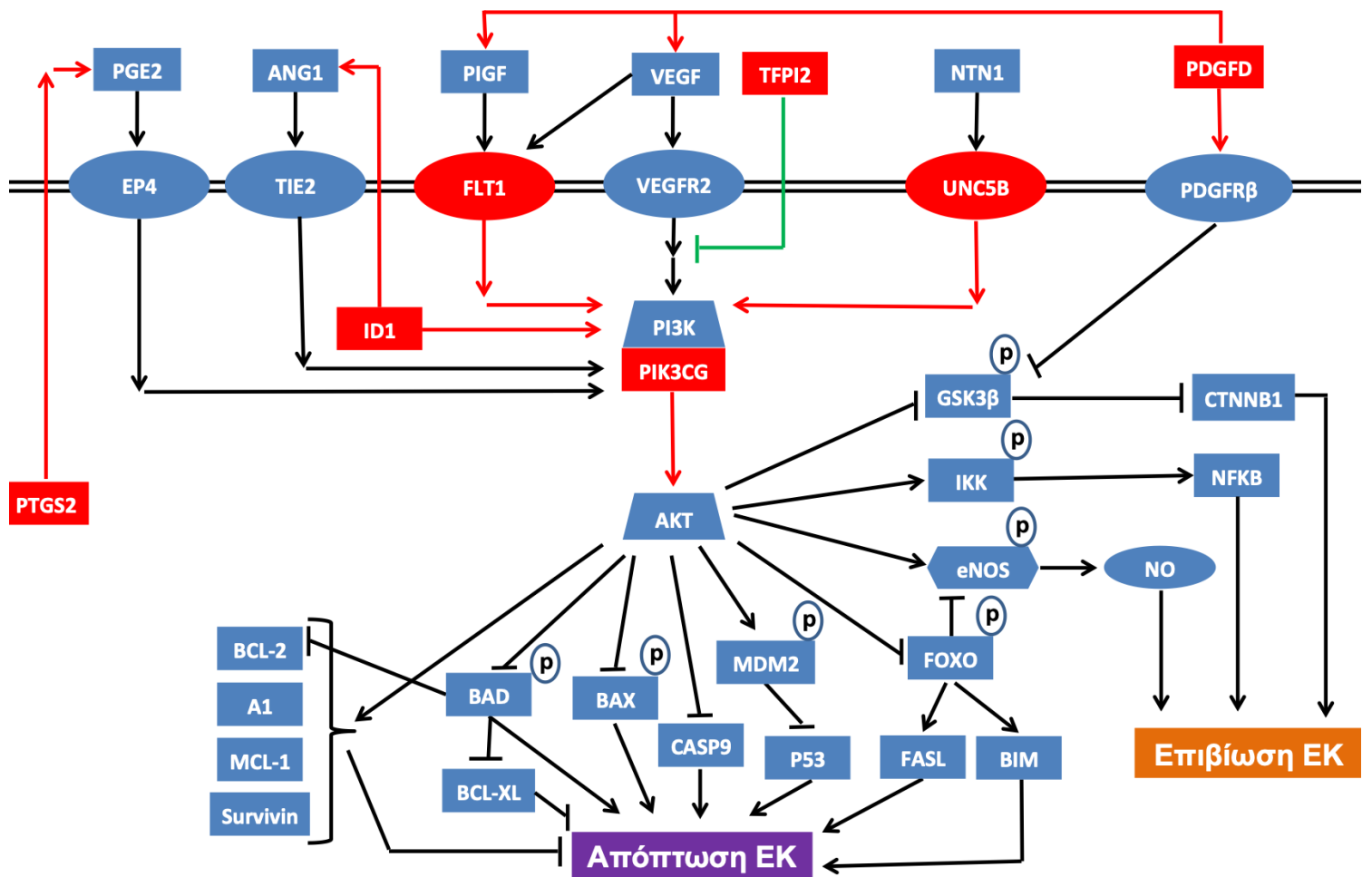
Εικόνα 4.30: Διαγραμματική απεικόνιση του μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης του cytoC των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) που επηρεάζεται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο. ➡ Η rHDL-apoE3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 11 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών υποστηρίζει την ενδεχόμενη απενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού από την rHDL-apoE3. Η πιθανή καταστολή της απελευθέρωσης του cytoC από τα μιτοχόνδρια και η μειωμένη ενεργοποίηση των κασπασών 9/3 θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίησης του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). ➡ : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ➡ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



Εικόνα 4.31: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού απόπτωσης των υποδοχέων θανάτου των ενδοθηλιακών κυττάρων (EK) που επηρεάζεται από την rHDL-αpoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αpoE3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης (υπερέκφραση) σε 3 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών προτείνει την ενδεχόμενη απενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού από την rHDL-αpoE3. Η πιθανή καταστολή της ενεργοποίησης των κασπασών 9/3 θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερέκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ┐ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.



Εικόνα 4.32: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού απόπτωσης του P53 των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης σε 2 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτο. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών προτείνει την ενδεχόμενη απενεργοποίηση του μονοπατιού του P53 από την rHDL-αροΕ3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: υποεκφραζόμενα γονίδια ή/και καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες). → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, : —| απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.

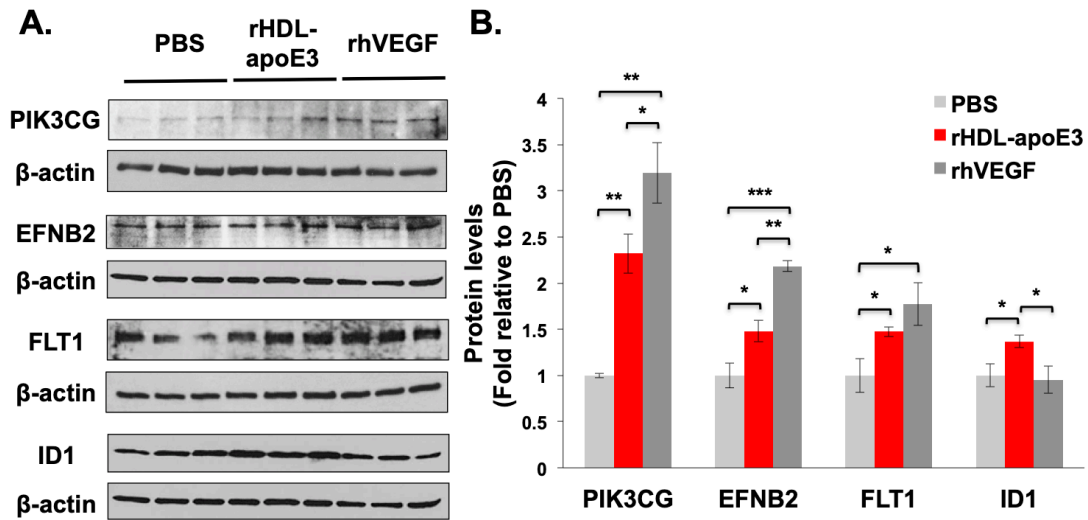


Εικόνα 4.33: Διαγραμματική απεικόνιση του μονοπατιού επιβίωσης PI3K/AKT των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ) που επηρεάζεται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Η rHDL-αροΕ3 προκάλεσε επιβεβαιωμένες (qRT-PCR) αλλαγές έκφρασης (υπερέκφραση) σε 7 γονίδια στα HAEC κύτταρα που σχετίζονται με την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό. Το σύνολο των μεταγραφικών αλλαγών υποστηρίζει την ενδεχόμενη ενεργοποίηση των κινασών PI3K και AKT από την rHDL-αροΕ3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών μορίων (όπως, FOXO1, BAD και κασπάσες 9/3) και επαγωγής της ενεργοποίησης των αντι-αποπτωτικών μορίων (όπως, eNOS και NFκB). Κόκκινο: υπερεκφραζόμενα γονίδια ή/και επαγωγή ενεργοποίησης του μονοπατιού. Πράσινο: καταστολή ενεργοποίησης/απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: γονίδια του μονοπατιού που δεν παρουσίασαν αλλαγές έκφρασης (μικροσυστοιχίες), p = φωσφορυλίωση. → : ενεργοποίηση ή αύξηση έκφρασης, ⊣ : απενεργοποίηση ή μείωση έκφρασης.

4.8. Η rHDL-αροΕ3 επάγει την πρωτεϊνική έκφραση γονιδίων-κλειδιών των μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα

Σε επόμενο στάδιο αξιολογήθηκε εάν οι αλλαγές έκφρασης που προκάλεσε η rHDL-αροΕ3 σε γονίδια-κλειδιά της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων παρατηρούνται και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση της rHDL-αροΕ3 στην πρωτεϊνική έκφραση τεσσάρων γονιδίων - PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 - με κεντρικό ρόλο στα μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, μικρών RHO-GTPασών και ιντεγκρινών, τα οποία επηρεάζονται σε μεταγραφικό επίπεδο από την rHDL-αροΕ3 στα HAEC κύτταρα (Ενότητες 4.6.2 και 4.7) (Πίνακας 4.2) (Εικόνες 4.15, 4.20-4.23). Η επώαση των HAEC κυττάρων με την rHDL-αροΕ3 οδήγησε στην υπερέκφραση των τεσσάρων αυτών γονιδίων (Ενότητες 4.6.2 και 4.7) (Πίνακες 4.2 και 4.7). Εφαρμόστηκαν αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των HCAEC κυττάρων που επώαστηκαν (12h) με rHDL-αροΕ3 (250μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για τη μέτρηση της έκφρασης των τεσσάρων πρωτεϊνών (Εικόνα 4.34A). Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν HCAEC κύτταρα που εκτέθηκαν (12h) σε rhVEGF (100 ng/ml), καθώς έχει δεχθεί ότι ο VEGF επάγει την πρωτεϊνική έκφραση των PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα [483-486]. Η rHDL-αροΕ3 οδήγησε σε αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα των PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 στα HCAEC κύτταρα κατά 2,321 (132,13% αύξηση, $P = 0,0018$), 1,479 (47,92% αύξηση, $P = 0,0266$), 1,475 (47,55% αύξηση, $P = 0,0333$) και 1,368 (36,84% αύξηση, $P = 0,0294$) φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS (Εικόνα 4.34B). Η επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση των PIK3CG, EFNB2 και FLT1 ήταν συγκρίσιμη με την αντίστοιχη αύξηση ($P \leq 0,029$) που προκάλεσε ο rhVEGF στα HCAEC κύτταρα (λόγος αλλαγής πρωτεϊνικής έκφρασης συγκριτικά με το PBS: PIK3CG = 3,191 (219,14% αύξηση), EFNB2 = 2,184 (118,41% αύξηση) και FLT1: 1,773 (77,33% αύξηση)) (Εικόνα 4.34B). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα ευρήματα των μικροσυστοιχιών και της ανάλυσης qRT-PCR για την επίδραση της rHDL-αροΕ3 στη γονιδιακή έκφραση των τεσσάρων υπό μελέτη γονιδίων στα HAEC κύτταρα (Πίνακες 4.2 και 4.7).

HCAEC

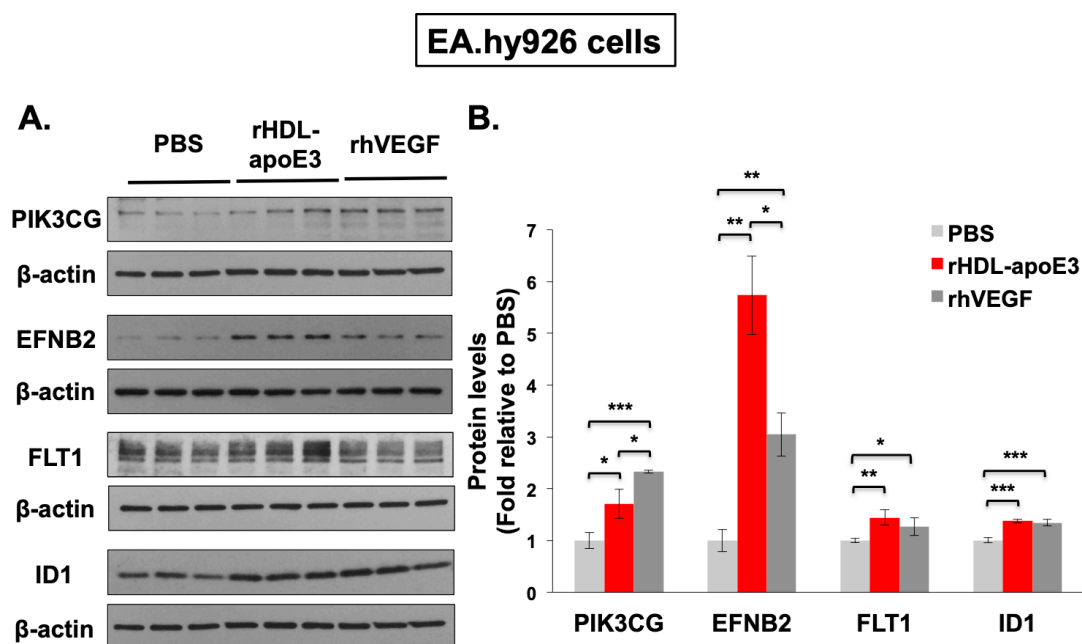


Εικόνα 4.34: Η rHDL-αποΕ3 αυξάνει την πρωτεϊνική έκφραση των PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 στα HCAEC κύτταρα, τα οποία έχουν κεντρικό ρόλο στα μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPασών και ιντεγκρινών. (A) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση (12h) με rHDL-αποΕ3 (250 μg/ml), PBS (κύτταρα αναφοράς) ή rhVEGF (100 ng/ml) (δείγμα θετικού ελέγχου). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων της κάθε μίας πρωτεΐνης για την εκάστοτε θεραπεία τα οποία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε πρωτεΐνη σε κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του δείγματος αναφοράς. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η επαγόμενη αύξηση στην έκφραση των πρωτεϊνών PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 από την rHDL-αποΕ3 ήταν ανεξάρτητη από τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιήθηκε, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα ανοσοαποτύπωσης western στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 που επώασηκαν (24h) με rHDL-αποΕ3 (100 μg/ml), PBS ή rhVEGF (100 ng/ml) (Εικόνα 4.35A). Η ικανότητα της rHDL-αποΕ3 να επάγει τα επίπεδα των τεσσάρων υπό μελέτη πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε στα κύτταρα αυτά. Ειδικότερα, όπως παρατηρήθηκε και στα HCAEC κύτταρα (Εικόνα 4.34), προέκυψε ότι η rHDL-αποΕ3 επάγει αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση των PIK3CG, FLT1 και ID1 στα EA.hy926 κύτταρα κατά

1,708 (70,76% αύξηση, $P = 0,045$), 1,444 (44,37% αύξηση, $P = 0,0053$) και 1,375 (37,53% αύξηση, $P = 0,0001$) φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS (Εικόνα 4.35B). Η επαγόμενη από την rHDL-αpoE3 αύξηση στην έκφραση των τριών αυτών πρωτεϊνών ήταν συγκρίσιμη με την αντίστοιχη αύξηση ($P < 0,049$) που προκλήθηκε από τον rhVEGF στα EA.hy926 κύτταρα (λόγος αλλαγής πρωτεϊνικής έκφρασης συγκριτικά με το PBS: PIK3CG = 2,325 (132,51% αύξηση), FLT1 = 1,268 (26,83% αύξηση) και ID1 = 1,341 (34,14% αύξηση)) (Εικόνα 4.35B). Η rHDL-αpoE3 οδήγησε σε σημαντική αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της EFNB2 στα EA.hy926 κύτταρα κατά 5,736 φορές (473,56% αύξηση, $P = 0,0019$) σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS, η οποία ήταν ακόμη μεγαλύτερη από την αντίστοιχη αύξηση που προκάλεσε ο rhVEGF (3,045 φορές ή 204,53% αύξηση, $P = 0,0059$) (Εικόνα 4.35B).

Συμπερασματικά, η επαγόμενη από την rHDL-αpoE3 υπερέκφραση των μορίων-κλειδιών των μονοπατιών μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPασών και ιντεγκρινών - PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 - σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης στα πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα επιβεβαιώνεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα.



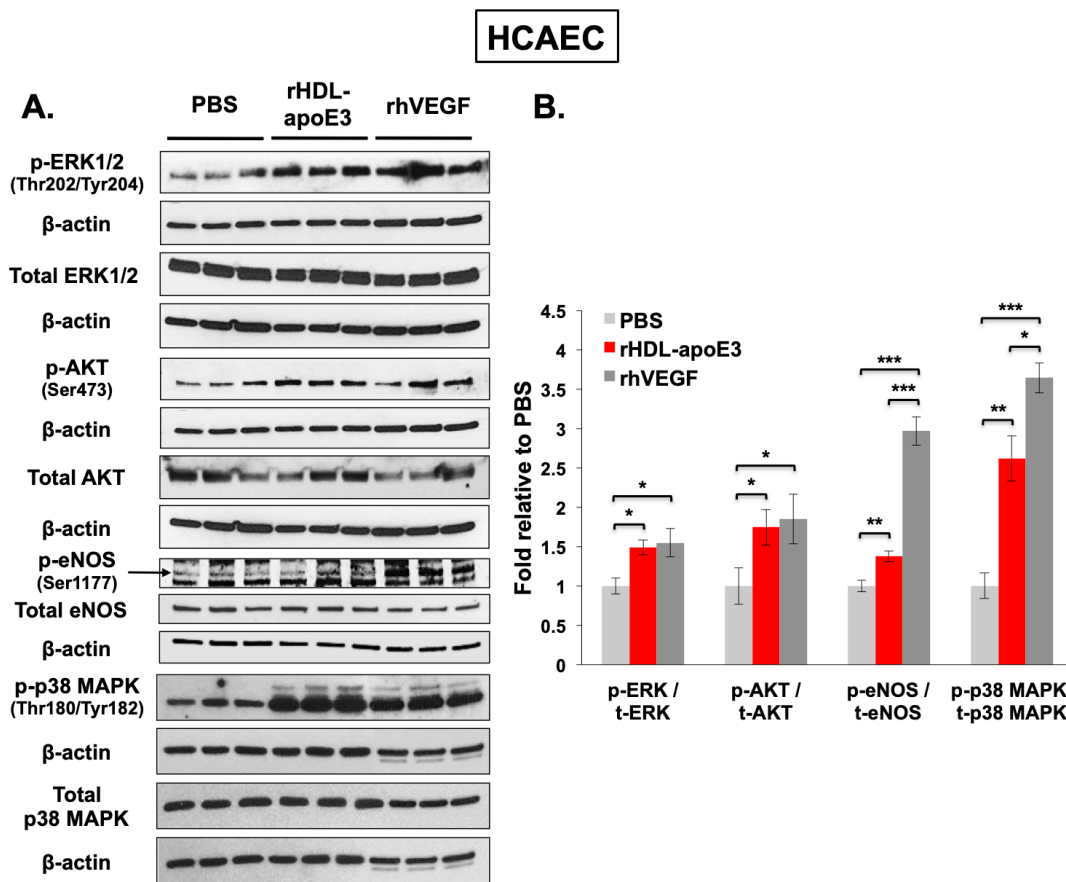
Εικόνα 4.35: Η rHDL-αpoE3 αυξάνει την πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων-κλειδιών PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 των μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPασών και ιντεγκρινών στα EA.hy926 κύτταρα. (A) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 με ανοσοαποτύπωση western στα EA.hy926 κύτταρα μετά από επώαση (24h) με rHDL-αpoE3 (100 μg/ml), PBS (κύτταρα αναφοράς) ή rhVEGF (δείγμα θετικού ελέγχου). Η πρωτεϊνική

έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων της κάθε μίας πρωτεΐνης για την εκάστοτε θεραπεία τα οποία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε πρωτεΐνη σε κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του δείγματος αναφοράς. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

4.9. Η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί σηματοδοτικά μόρια-τελεστές της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα

Προκειμένου να μελετηθεί εάν η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPασών και ιντεγκρινών στα HCAEC κύτταρα, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης βασικών σηματοδοτικών μορίων-τελεστών της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που συμμετέχουν σε αυτά, ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK [487, 488]. Οι κινάσες ERK1/2 ενεργοποιούνται καθοδικά των MEK1/2 κινασών στο μονοπάτι MEK1/2/ERK1/2 και των ιντεγκρινών [489]. Τα μόρια AKT και eNOS ενεργοποιούνται καταρροϊκά της PI3K κινάσης στο μονοπάτι PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των ιντεγκρινών [490, 491]. Η p38 MAPK κινάση ενεργοποιείται καθοδικά της RAC1-GTPάσης στο μονοπάτι των RHO-GTPασών και των ιντεγκρινών [492, 493]. Εφαρμόστηκαν αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των HCAEC κυττάρων μετά από επώαση (30 min) με rHDL-apoE3 (250 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων και ολικών μορφών των τεσσάρων υπό μελέτη μορίων (Εικόνα 4.36A). Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν HCAEC κύτταρα που εκτέθηκαν σε rhVEGF (100 ng/ml) (30 min), καθώς έχει δεχθεί ότι ο VEGF επάγει την ενεργοποίηση των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα [487]. Η rHDL-apoE3 οδήγησε σε αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής του εκάστοτε μορίου προς τα επίπεδα της εκάστοτε ολικής πρωτεΐνης) των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK στα HCAEC κύτταρα κατά 1,487 (48,71% αύξηση, $P = 0,0122$), 1,747 (74,68% αύξηση, $P = 0,0416$), 1,377 (37,73% αύξηση, $P = 0,0099$) και 2,621 (162,09% αύξηση, $P = 0,004$) φορές, αντίστοιχα, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς PBS (Εικόνα 4.36B). Η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 αύξηση στη φωσφορυλίωση των τεσσάρων αυτών μορίων ήταν συγκρίσιμη με την αντίστοιχη αύξηση ($P \leq 0,048$) που προκάλεσε ο rhVEGF στα HCAEC κύτταρα (λόγος αλλαγής πρωτεϊνικής έκφρασης συγκριτικά με το PBS: ERK1/2 = 1,548 (54,76% αύξηση), AKT = 1,848 (84,77% αύξηση), eNOS = 2,968 (196,79% αύξηση) και p38

MAPK = 3,646 (264,58% αύξηση)) (Εικόνα 4.36B). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ολικών μορφών (φωσφορυλιωμένες και μη φωσφορυλιωμένες μορφές) των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-αpoE3 δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS ($P > 0,05$) (Εικόνα 4.36A). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν μία μετατόπιση από τις μη φωσφορυλιωμένες στις φωσφορυλιωμένες μορφές των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK απουσία αλλαγών έκφρασης των ολικών πρωτεϊνικών μορφών τους, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση των μορίων αυτών από την rHDL-αpoE3.



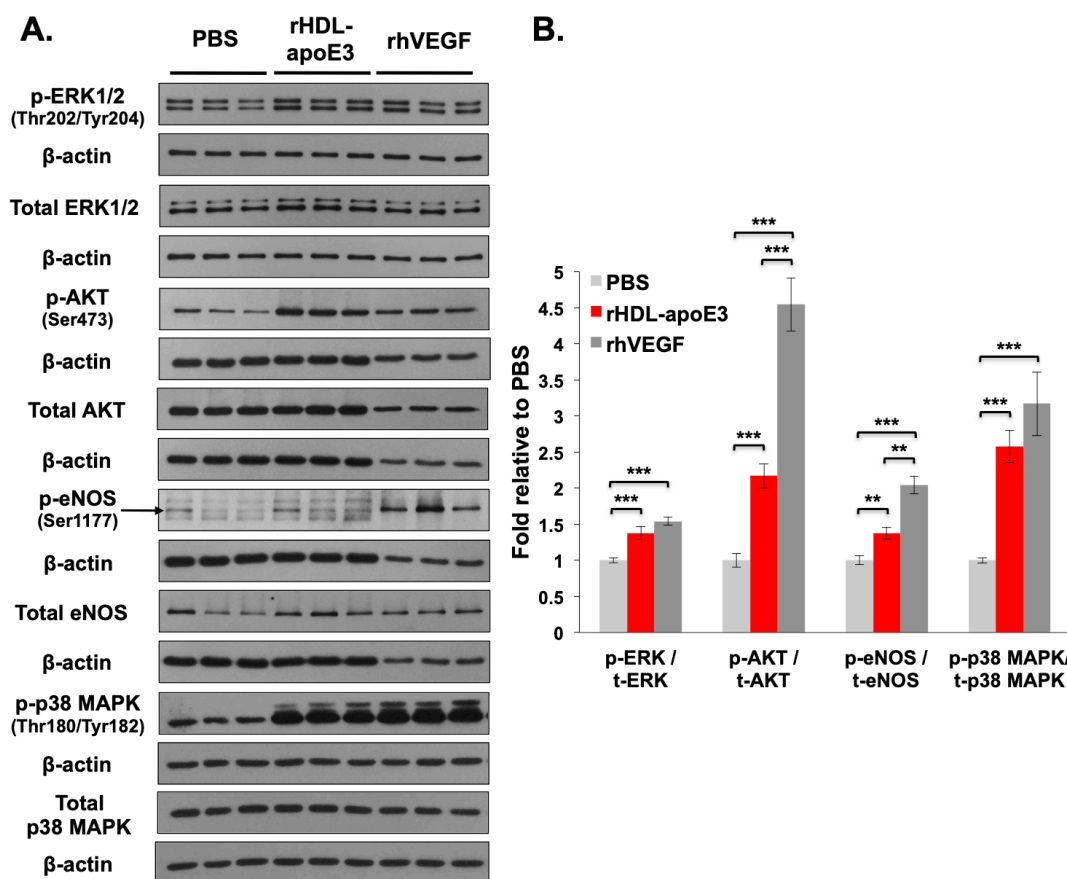
Εικόνα 4.36: Η rHDL-αpoE3 αυξάνει τη φωσφορυλίωση των μορίων-τελεστών ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK των μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPρασών και ιντεγκρινών στα HCAEC κύτταρα. (A) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών (total) μορφών των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση (30min) με rHDL-αpoE3 (250 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) ή rhVEGF (100 ng/ml) (δείγμα θετικού ελέγχου). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων της

φωσφορυλιωμένης (p-) μορφής προς την έκφραση της ολικής (t-) πρωτεΐνης) του κάθε ενός μορίου για την εκάστοτε θεραπεία. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών (t-) μορφών της κάθε μίας πρωτεΐνης για την εκάστοτε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (p-) μορφής του κάθε ενός μορίου κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της εκάστοτε ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε πρωτεΐνη σε κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή±τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του δείγματος αναφοράς. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. (A) Η ζώνη με μοριακό βάρος 140kDa αντιστοιχεί στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης eNOS (p-eNOS) και σημειώνεται με βέλος. Η υψηλότερου μοριακού βάρους πάνω ζώνη (160kDa) αντιπροσωπεύει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ισομορφής nNOS, ενώ η χαμηλότερου μοριακού βάρους κάτω ζώνη (130kDa) αντιστοιχεί στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης iNOS ισομορφής.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η επαγόμενη αύξηση στη φωσφορυλίωση των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK από την rHDL-apoE3 ήταν ανεξάρτητη από τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιήθηκε, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα ανοσοαποτύπωσης western στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των EA.hy926 κυττάρων που επώαστηκαν (30min) με rHDL-apoE3 (250 μg/ml), PBS ή rhVEGF (100 ng/ml) (Εικόνα 4.37A). Στα κύτταρα αυτά επιβεβαιώθηκε η ικανότητα της rHDL-apoE3 να ενεργοποιεί τα τέσσερα υπό μελέτη μόρια. Ειδικότερα, όπως παρατηρήθηκε και στα HCAEC κύτταρα (Εικόνα 4.36), προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 αυξάνει τη φωσφορυλίωση των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK στα EA.hy926 κύτταρα κατά 1,375 (37,53% αύξηση, $P = 0,001$), 2,169 (116,91% αύξηση, $P < 0,0001$), 1,377 (37,70% αύξηση, $P = 0,0048$) και 2,576 (157,61% αύξηση, $P < 0,0001$) φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS (Εικόνα 4.37B). Η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 αύξηση στη φωσφορυλίωση των τεσσάρων υπό μελέτη μορίων ήταν συγκρίσιμη με την αντίστοιχη αύξηση ($P < 0,0006$) που προκλήθηκε στα HCAEC κύτταρα από τον rhVEGF (λόγος αλλαγής πρωτεϊνικής έκφρασης συγκριτικά με το PBS: ERK1/2 = 1,539 (53,98% αύξηση), AKT = 4,545 (354,48% αύξηση), eNOS = 2,042 (104,235% αύξηση) και p38 MAPK = 3,1697 (216,97% αύξηση)) (Εικόνα 4.37B).

Συμπερασματικά, η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί βασικά μόρια-τελεστές των μονοπατιών μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPασών και ιντεγκρινών στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών.

EA.hy926 cells

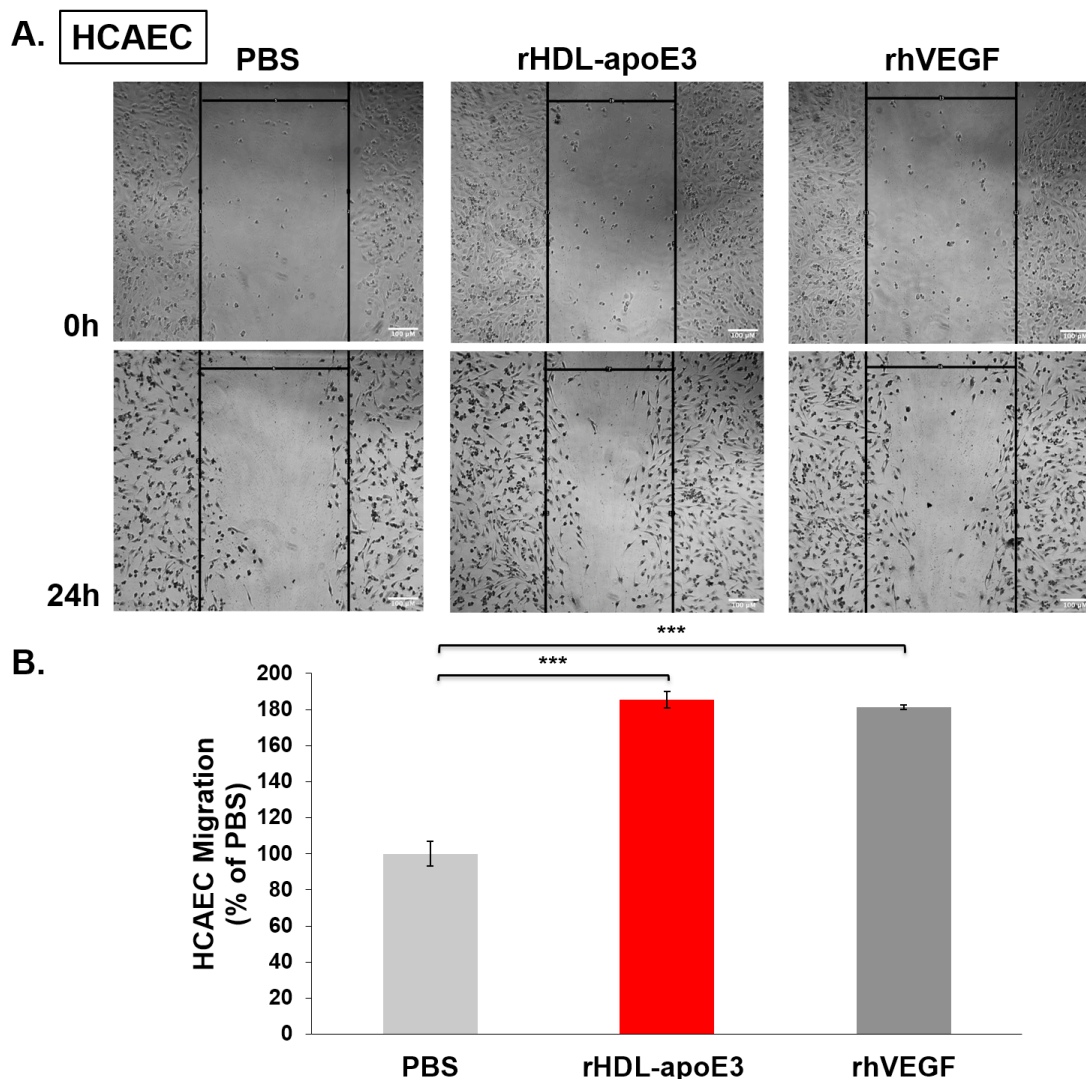


Εικόνα 4.37: Η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μόρια-τελεστές ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK των μονοπατιών μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPασών και ιντεγκρινών στα EA.hy926 κύτταρα. (A) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών (total) μορφών των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK με ανοσοαποτύπωση western στα EA.hy926 κύτταρα μετά από έκθεση (30min) σε rHDL-apoE3 (250 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) ή rhVEGF (100 ng/ml) (δείγμα θετικού ελέγχου). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης (p-) μορφής προς την έκφραση της ολικής (t-) πρωτεΐνης) του κάθε ενός μορίου για την εκάστοτε θεραπεία. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών (t-) μορφών της κάθε μίας πρωτεΐνης για την εκάστοτε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (p-) μορφής του εκάστοτε μορίου κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της εκάστοτε ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε πρωτεΐνη σε κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή±τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και

παρουσιάζονται ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του δείγματος αναφοράς. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. (A) Η ζώνη που αντιστοιχεί στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης eNOS (p-eNOS) έχει μοριακό βάρος 140kDa και σημειώνεται με βέλος. Η υψηλότερου μοριακού βάρους ζώνη (160kDa) αντιπροσωπεύει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ισομορφής nNOS, ενώ η χαμηλότερου μοριακού βάρους ζώνη (130kDa) αντιστοιχεί στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ισομορφής iNOS.

4.10. Η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων

Με βάση τις μοριακές αλλαγές σε επίπεδο γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης και σε βαθμό ενεργοποίησης που προκάλεσε η rHDL-apoE3 στα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, RHO-GTPασών και ιντεγκρινών στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (Ενότητες 4.6.2, 4.7, 4.8-4.9) (Πίνακες 4.2 και 4.7) (Εικόνες 4.15, 4.20-4.23, 4.34-4.37), μελετήθηκε στη συνέχεια η επίδρασή της στη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Εφαρμόστηκαν *in vitro* δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (100 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 24h (Εικόνα 4.38A). Κύτταρα HCAEC που εκτέθηκαν σε rhVEGF (100 ng/ml) για 24h χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα θετικού ελέγχου της κυτταρικής μετανάστευσης, καθώς έχει δεχθεί ότι ο VEGF επάγει μετανάστευση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης ποικίλων μοριακών μηχανισμών [478, 479]. Σε συμφωνία με τα μοριακά ευρήματα γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης και ενεργοποίησης (Ενότητες 4.6.2, 4.7 και 4.8-4.9) (Πίνακες 4.2 και 4.7) (Εικόνες 4.20-4.23, 4.34, 4.36), προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 αυξάνει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων κατά 85,35% ($P = 0,0002$) σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS (Εικόνα 4.38B). Η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 αύξηση στη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων ήταν παρόμοια με την αντίστοιχη αύξηση που προκάλεσε ο rhVEGF στα κύτταρα αυτά (81,33% αύξηση συγκριτικά με το PBS, $P = 0,0002$) (Εικόνα 4.38B).



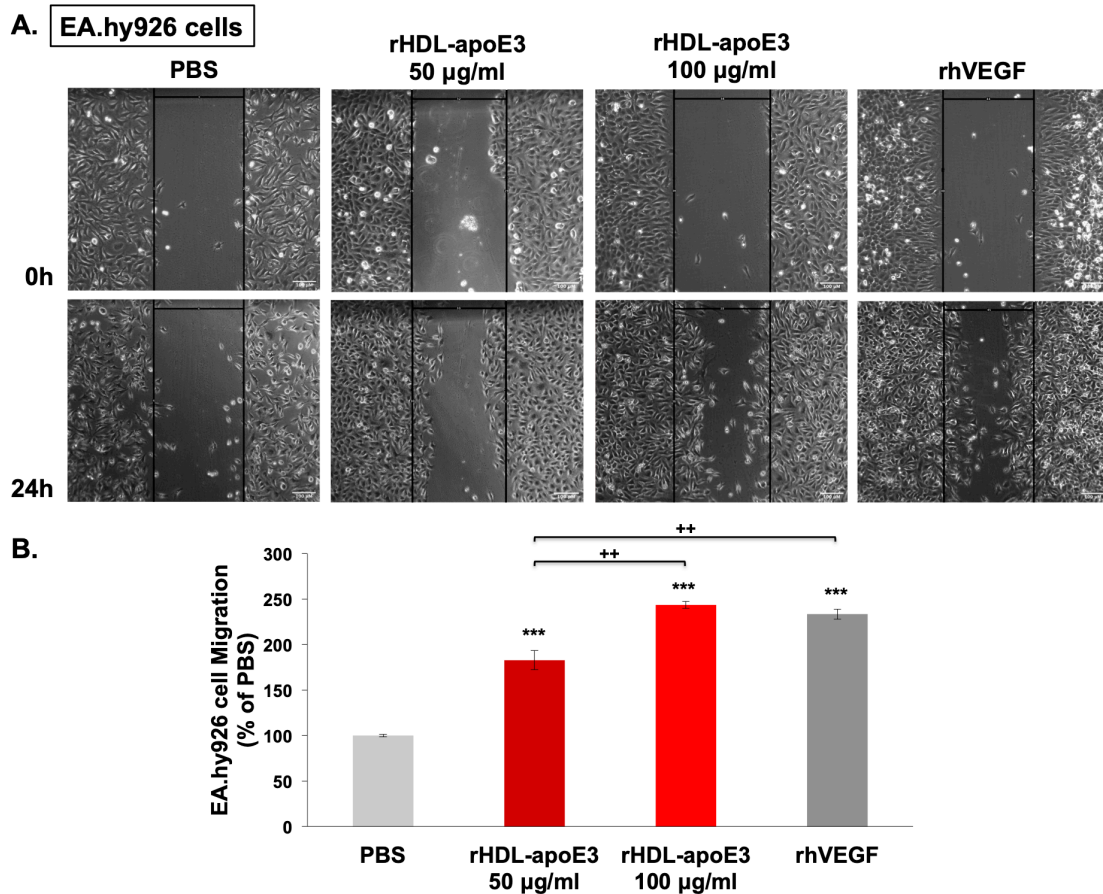
Εικόνα 4.38: Η rHDL-apoE3 αυξάνει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίας των HCAEC κυττάρων μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (100 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) ή rhVEGF (100 ng/ml) (δείγμα θετικού ελέγχου κυτταρικής μετανάστευσης) για 24h στη δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία 0h και 24h μετά τη χορήγηση της εκάστοτε θεραπείας. Οι μαύρες κάθετες γραμμές οριοθετούν την περιοχή της «πληγής». Scale bar 100 µm. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων στην περιοχή της «πληγής» μετά από 24h επώασης με την εκάστοτε θεραπεία. Τα αποτελέσματα για κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως ποσοστό % ως προς τη μετανάστευση των κυττάρων αναφοράς. *** $P \leq 0,001$.

Η ικανότητα της rHDL-apoE3 να επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων επιβεβαιώθηκε περαιτέρω στα EA.hy926 κύτταρα. Εξετάστηκαν δύο

διαφορετικές συγκεντρώσεις της rHDL-apoE3, 50 $\mu\text{g/ml}$ και 100 $\mu\text{g/ml}$, εφαρμόζοντας δοκιμασίες προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής στα κύτταρα αυτά μετά από επώαση για 24h (Εικόνα 4.39A). Σε συμφωνία με τα μοριακά ευρήματα γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης και ενεργοποίησης (Ενότητες 4.6.2, 4.7, 4.8-4.9) (Πίνακες 4.2 και 4.7) (Εικόνες 4.20-4.23, 4.35, 4.37), και όπως παρατηρήθηκε και στα HCAEC κύτταρα (Εικόνα 4.38), προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ και 100 $\mu\text{g/ml}$ αυξάνει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων κατά 82,76% ($P = 0,0007$) και 143,51% ($P < 0,0001$), αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS (Εικόνα 4.39B). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων που παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$ ήταν παρόμοια με τη μετανάστευση που προκλήθηκε από τον rhVEGF (100 ng/ml, 24h) στα κύτταρα αυτά (133,45% αύξηση συγκριτικά με το PBS, $P < 0,0001$) (Εικόνα 4.39B). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση στη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων που προκάλεσε η rHDL-apoE3 σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$ ήταν, επίσης, συγκρίσιμη με την αντίστοιχη αύξηση που παρατηρήθηκε στα κύτταρα αυτά μετά από επώαση (24h) με την hHDL σε συγκέντρωση 250 $\mu\text{g/ml}$ (με βάση τη συνολική ποσότητα των πρωτεϊνικών συστατικών της) (191,21% αύξηση συγκριτικά με το PBS, $P = 0,0002$) (Ενότητα 4.11) (Εικόνα 4.41).

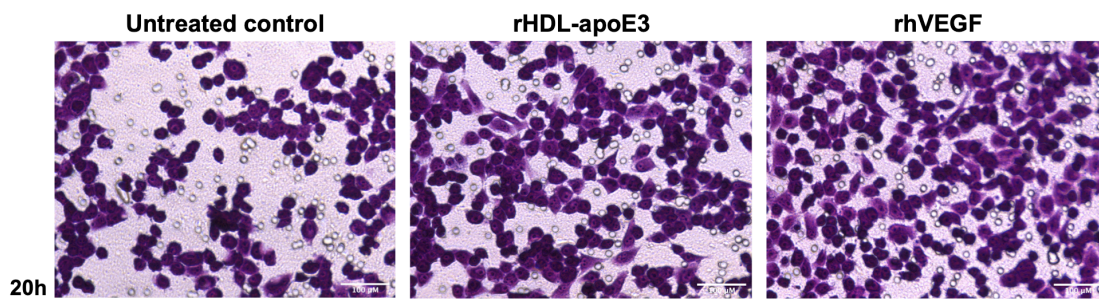
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η ικανότητα της rHDL-apoE3 να επάγει μετανάστευση στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, εφαρμόστηκαν *in vitro* δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης διαμέσου πορώδους μεμβράνης (τύπου «Transwell») στα EA.hy926 κύτταρα (Εικόνα 4.40A). Σε συμφωνία με τα ευρήματα από τις δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» (Εικόνα 4.39), προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 επάγει αύξηση στη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων μετά από 20h επώασης κατά 57,40% ($P = 0,0052$) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου της ενδογενούς κυτταρικής μετανάστευσης (κύτταρα αναφοράς) (Εικόνα 4.40B). Η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 αύξηση στη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων ήταν παρόμοια με την αντίστοιχη αύξηση που προκάλεσε ο rhVEGF στα κύτταρα αυτά (73,99% αύξηση συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς, $P = 0,0002$) (Εικόνα 4.40B).

Συμπερασματικά, η rHDL-apoE3 (100 $\mu\text{g/ml}$) επάγει μετανάστευση σε δύο διαφορετικούς τύπους ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου, τα HCAEC και τα EA.hy926 κύτταρα, σε βαθμό παρόμοιο με τον rhVEGF και συγκρίσιμο με την hHDL (250 $\mu\text{g/ml}$).

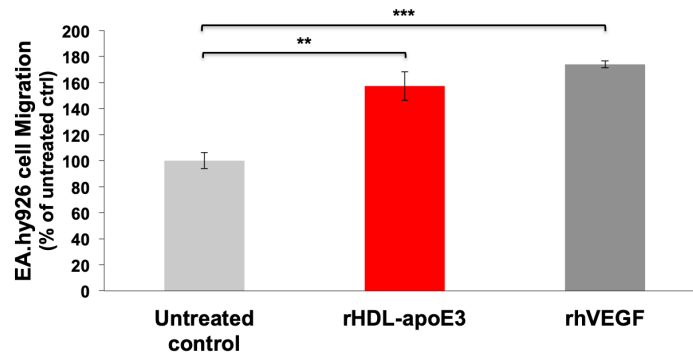


Εικόνα 4.39: Η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίας των EA.hy926 κυττάρων μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 (50 µg/ml ή 100 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) ή rhVEGF (100 ng/ml) (δείγμα θετικού ελέγχου κυτταρικής μετανάστευσης) για 24h στη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία 0h και 24h μετά τη χορήγηση της εκάστοτε θεραπείας. Οι μαύρες κάθετες γραμμές οριοθετούν την περιοχή της «πληγής». Scale bar 100 µm. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μετανάστευσης των EA.hy926 κυττάρων στην περιοχή της «πληγής» μετά από 24h επώασης με την εκάστοτε θεραπεία. Τα αποτελέσματα για κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως ποσοστό % ως προς τη μετανάστευση των κυττάρων αναφοράς. *** $P \leq 0,001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, ++ $P \leq 0,01$.

A. **EA.hy926 cells**



B.



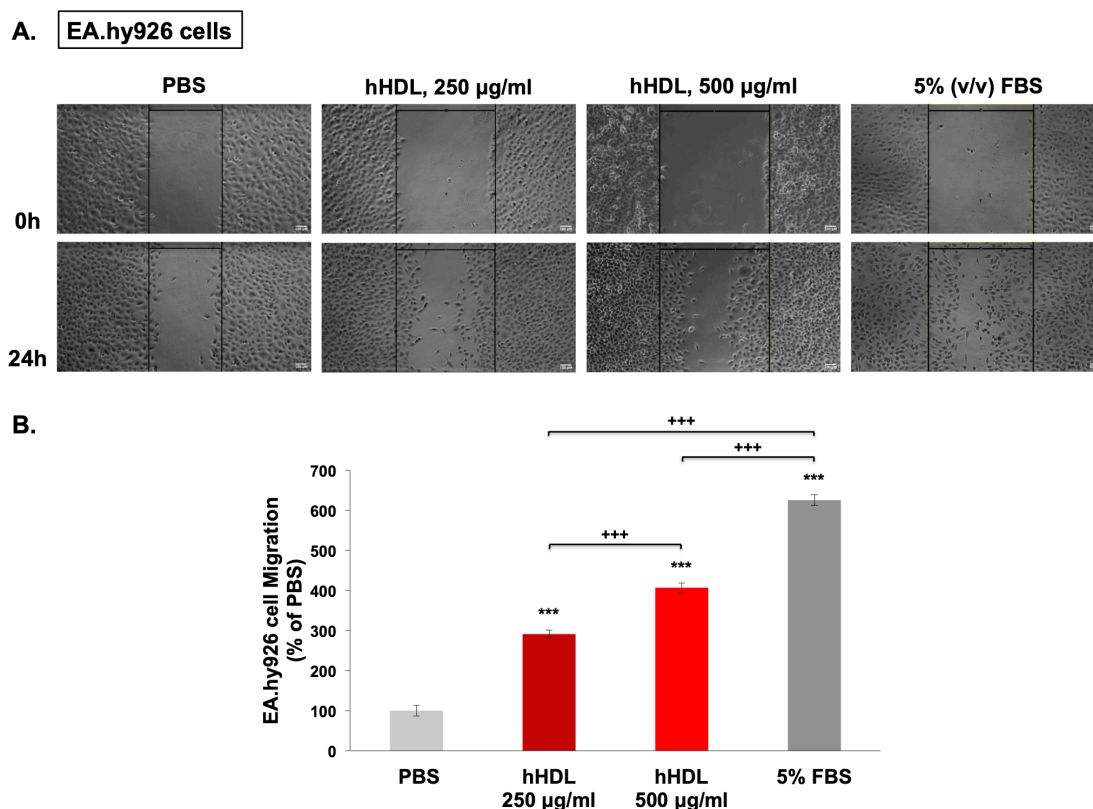
Εικόνα 4.40: Η rHDL-apoE3 αυξάνει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίας των EA.hy926 κυττάρων μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (100 µg/ml) ή rhVEGF (100 ng/ml) (δείγμα θετικού ελέγχου κυτταρικής μετανάστευσης) για 20h στη δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης διαμέσου πορώδους μεμβράνης (τύπου «Transwell»). Κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε rHDL-apoE3 ή rhVEGF αποτέλεσαν το δείγμα ελέγχου της ενδογενούς κυτταρικής μετανάστευσης (κύτταρα αναφοράς, «Untreated control»). Scale bar 100 µm. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μετανάστευσης των EA.hy926 κυττάρων στην κάτω επιφάνεια της πορώδους μεμβράνης σε κάθε ένθετο «transwell» μετά από 20h επώασης με την εκάστοτε θεραπεία. Τα αποτελέσματα για κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως ποσοστό % ως προς τη μετανάστευση των κυττάρων αναφοράς. ** $P \leq 0,01$ και *** $P \leq 0,001$.

4.11. Η hHDL επάγει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων

Στα πειράματα βελτιστοποίησης της *in vitro* δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα EA.hy926 κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η hHDL, η οποία απομονώθηκε από ορό ανθρώπου. Εξετάστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις της hHDL, 250 µg/ml και 500 µg/ml, οι οποίες υπολογίστηκαν με βάση τη συνολική ποσότητα των πρωτεϊνικών συστατικών της (αντιστοιχούν σε 12,5 µg/ml και 25 µg/ml, αντίστοιχα, με βάση την περιεχόμενη ποσότητα της apoA-I στην hHDL) εφαρμόζοντας

δοκιμασίες προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής στα κύτταρα αυτά μετά από 24h επώασης (Εικόνα 4.41A). Κύτταρα EA.hy926 που εκτέθηκαν σε PBS ή 5% (v/v) FBS για 24h χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα αναφοράς (κύτταρα αναφοράς) ή δείγμα θετικού ελέγχου της κυτταρικής μετανάστευσης, αντίστοιχα. Η hHDL σε συγκέντρωση 250 µg/ml και 500 µg/ml αύξησε τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων κατά 191,21% ($P = 0,0002$) και 306,94% ($P < 0,0001$), αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς PBS (Εικόνα 4.41B). Αναμενόμενα, η επαγόμενη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων από την hHDL και στις δύο συγκεντρώσεις ήταν χαμηλότερη σε σχέση με την κυτταρική μετανάστευση που παρατηρήθηκε στο δείγμα θετικού ελέγχου (525,41% αύξηση συγκριτικά με το PBS, $P < 0,0001$).

Συμπερασματικά, η hHDL επάγει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.



Εικόνα 4.41: Η hHDL αυξάνει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίας των EA.hy926 κυττάρων μετά από επώαση με hHDL (250 µg/ml και 500 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) ή 5% (v/v) FBS (δείγμα θετικού ελέγχου κυτταρικής μετανάστευσης) για 24h στη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία 0h και 24h μετά τη χορήγηση της εκάστοτε θεραπείας. Οι μαύρες κάθετες γραμμές οριοθετούν την περιοχή

της «πληγής». Scale bar 100μm. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μετανάστευσης των EA.hy926 κυττάρων στην περιοχής της «πληγής» μετά από 24h επώασης με την εκάστοτε θεραπεία. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα από δύο ανεξάρτητα πειράματα με 2 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα (n = 4 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως ποσοστό % ως προς τη μετανάστευση των κυττάρων αναφοράς. *** $P \leq 0,001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, +++ $P \leq 0,001$.

4.12. Μελέτη του ρόλου των κινασών MEK1/2 και PI3K στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων και ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μορίων-τελεστών που εμπλέκονται στα μονοπάτια μετανάστευσης των κυττάρων αυτών

4.12.1. Έλεγχος της λειτουργικότητας των χημικών αναστολέων των κινασών MEK1/2 και PI3K στα HCAEC κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της λειτουργικότητας του αναστολέα ενεργοποίησης των κινασών MEK1/2 (PD98059, PD) και του αναστολέα ενεργοποίησης της κινάσης PI3K (LY294002, LY) στα HCAEC κύτταρα μέσω μέτρησης της φωσφορυλίωσης των καθοδικών κινασών-στόχων τους, ERK1/2 και AKT, αντίστοιχα, με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Εικόνες 4.42-4.43). Εξετάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε αναστολέα (PD: 1μM, 2μM, 5μM, και LY: 1μM, 10μM, 25μM, 50μM, 80μM) και διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης (1h, 24h) των HCAEC κυττάρων με αυτόν, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση του κάθε αναστολέα στο απαιτούμενο χρονικό διάστημα επώασης (Εικόνες 4.42-4.43). Οι δύο αυτές παράμετροι καθορίζουν την ικανότητα του εκάστοτε αναστολέα να καταστέλλει αποτελεσματικά την ενεργοποίηση των κινασών-στόχων του, χωρίς όμως να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων στα χρονικά σημεία του εκάστοτε πειράματος. Κύτταρα HCAEC που επωάστηκαν με DMSO στα χρονικά διαστήματα 1h και 24h αποτέλεσαν το δείγμα αρνητικού ελέγχου.

Για τη μελέτη της λειτουργικότητας του αναστολέα PD μετά από επώαση των HCAEC κυττάρων για 1h εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1μM, 2μM και 5μM (Εικόνα 4.42A). Ο αναστολέας PD σε συγκέντρωση 5μM μείωσε τη φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2 στα HCAEC κύτταρα κατά 66,51% ($P < 0,0001$) σε σχέση με τα κύτταρα απουσία αναστολέα (δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO) (Εικόνα 4.42B). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών μεταξύ των κυττάρων παρουσία του αναστολέα PD σε συγκέντρωση 1μM ή 2μM και του δείγματος

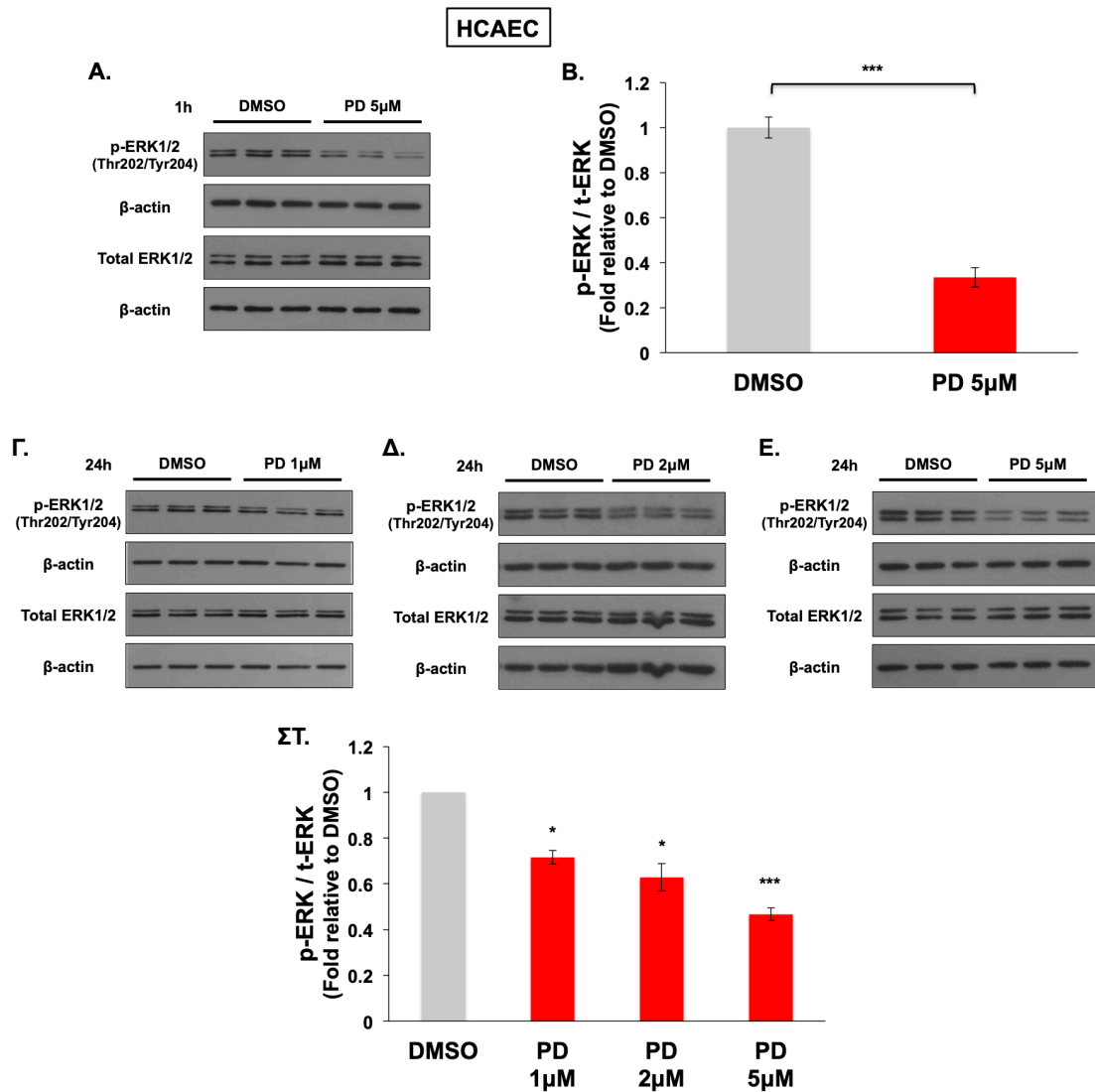
αρνητικού ελέγχου DMSO. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, ο αναστολέας PD χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 5μM στις αναλύσεις πρωτεϊνικής έκφρασης/ενεργοποίησης στα HCAEC κύτταρα που προεπώαστηκαν με τον PD ή το DMSO για 1h και κατόπιν εκτέθηκαν στην rHDL-αροE3 για 30min παρουσία ή απουσία του αναστολέα (Ενότητα 4.12.3).

Για τη μελέτη της λειτουργικότητας του αναστολέα PD μετά από επώαση των HCAEC κυττάρων για 24h εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1μM, 2μM και 5μM (Εικόνα 4.42Γ-Ε). Ο αναστολέας PD σε συγκέντρωση 1μM, 2μM και 5μM μείωσε τη φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2 στα HCAEC κύτταρα κατά 28,40% ($P = 0,0304$), 37,14% ($P = 0,0235$) και 53,3% ($P < 0,0001$), αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.42ΣΤ). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ένα δόσοεξαρτώμενο τρόπο δράσης του αναστολέα PD στα HCAEC κύτταρα. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις 1μM και 2μM, παρουσία του αναστολέα PD σε συγκέντρωση 5μM παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα και απόπτωση/κυτταρικός θάνατος των κυττάρων συγκριτικά το δείγμα αρνητικού ελέγχου (DMSO), αν και σε μικρό βαθμό. Με βάση τα ευρήματα αυτά, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 2μM του αναστολέα PD για τις δοκιμασίες μετανάστευσης στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-αροE3 για 24h παρουσία ή απουσία του αναστολέα (Ενότητα 4.12.2).

Για τη μελέτη της λειτουργικότητας του αναστολέα LY μετά από επώαση των HCAEC κυττάρων για 1h εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1μM, 10μM, 25μM, 50μM και 80μM (Εικόνα 4.43Α-Ε). Ο αναστολέας LY μείωσε αποτελεσματικά την ενδογενή ενεργοποίηση της κινάσης AKT στα HCAEC κύτταρα σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Ειδικότερα, ο αναστολέας LY σε συγκέντρωση 1μM, 10μM και 25μM μείωσε τη φωσφορυλίωση της AKT στα HCAEC κύτταρα κατά 68,19%, 96,72% και 94,35% ($P < 0,0001$), αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.43ΣΤ). Ομοίως, παρουσία του αναστολέα LY σε συγκέντρωση 50μM και 80μM μειώθηκε η φωσφορυλίωση της AKT στα HCAEC κύτταρα κατά 74,62% ($P = 0,007$) και 93,90% ($P = 0,0005$), αντίστοιχα, συγκριτικά με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.43ΣΤ). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 10μM και 25μM του αναστολέα LY για τις αναλύσεις πρωτεϊνικής έκφρασης/ενεργοποίησης στα HCAEC κύτταρα που προεπώαστηκαν με τον αναστολέα LY ή το DMSO για 1h και κατόπιν εκτέθηκαν στην rHDL-αροE3 για 30min παρουσία ή απουσία του αναστολέα (Ενότητα 4.12.3).

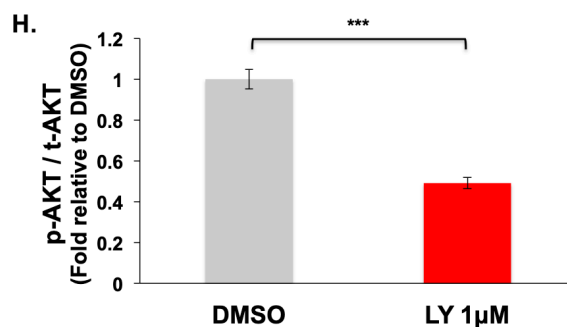
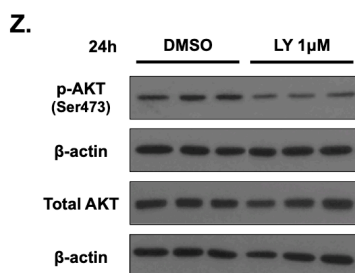
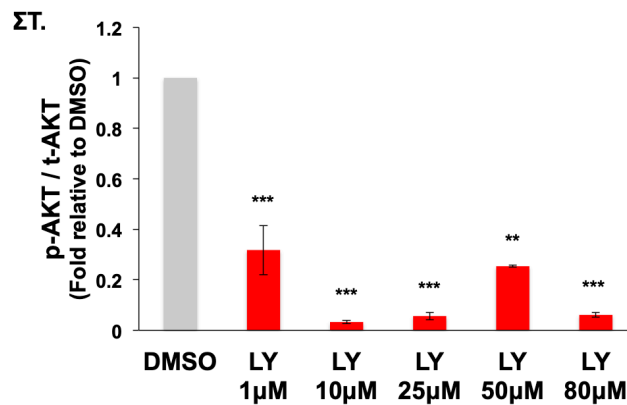
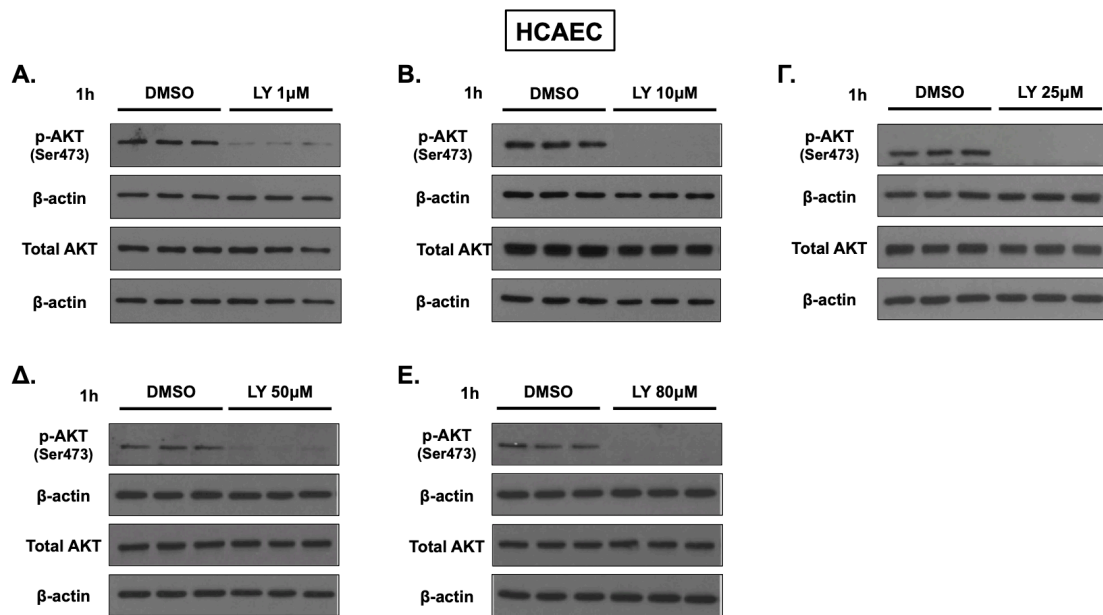
Για τη μελέτη της λειτουργικότητας του αναστολέα LY μετά από επώαση των HCAEC κυττάρων για 24h εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1μM και 25μM (Εικόνα 4.43Z). Ο αναστολέας LY σε συγκέντρωση 1μM μείωσε τη φωσφορυλίωση της AKT στα HCAEC κύτταρα κατά 50,90% ($P < 0,0001$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.43H). Παρουσία του αναστολέα LY σε συγκέντρωση 25μM παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη κυτταροτοξικότητα και απόπτωση/κυτταρικός θάνατος των κυττάρων συγκριτικά με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO, με αποτέλεσμα να καταστεί αδύνατη η ολοκλήρωση του πειράματος. Ως εκ τούτου, ο αναστολέας LY χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1μM και όχι 25μM στις δοκιμασίες μετανάστευσης και αναλύσεις πρωτεϊνικής έκφρασης/ενεργοποίησης στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-aroE3 για 24h παρουσία ή απουσία του αναστολέα (Ενότητες 4.12.2, 4.12.3).

Συμπερασματικά, οι αναστολείς PD και LY στις επιλεγμένες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις καταστέλλουν αποτελεσματικά την ενδογενή ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2 και AKT, αντίστοιχα, στα HCAEC κύτταρα στα χρονικά διαστήματα επώασης 1h και 24h.



Εικόνα 4.42: Ο αναστολέας των MEK1/2 κινασών (PD98059, PD) μειώνει τα επίπεδα της ενδογενούς φωσφορυλίωσης των ERK1/2 κινασών στα HCAEC κύτταρα. (A) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των ERK1/2 με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση για 1h με τον αναστολέα PD σε συγκέντρωση 5μM ή το DMSO (δείγμα αρνητικού ελέγχου). (Γ-Ε) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των ERK1/2 με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση για 24h με τον αναστολέα PD σε συγκέντρωση 1μM, 2μM και 5μM ή το DMSO (δείγματα αρνητικού ελέγχου). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (B, ΣΤ) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων των φωσφορυλιωμένων μορφών προς την έκφραση της ολικής πρωτεΐνης) απουσία (DMSO δείγματα) ή παρουσία του αναστολέα PD για 1h (B) και 24h (ΣΤ). Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των

ERK1/2 για την εκάστοτε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) μορφών των ERK1/2 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα από ένα (Γ-Δ) ή δύο (Α, Ε) ανεξάρτητα πειράματα με 3 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα (n = 3-6 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τη φωσφορυλίωση των ERK1/2 του δείγματος αρνητικού ελέγχου. * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ σε σχέση με το δείγμα "DMSO".



Εικόνα 4.43: Ο αναστολέας της κινάσης PI3K (LY294002, LY) μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της ενδογενούς φωσφορυλίωσης της κινάσης AKT στα HCAEC κύτταρα. (A-E) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης (p-) και ολικής μορφής της AKT με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση για 1h με τον αναστολέα LY σε συγκέντρωση 1μM (A), 10μM (B), 25μM (Γ), 50μM (Δ) και 80μM (E) ή το DMSO (δείγματα αρνητικού ελέγχου). (Z) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης (p-) και ολικής μορφής της AKT με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση για 24h με τον αναστολέα LY σε συγκέντρωση 1μM ή το DMSO (δείγμα αρνητικού ελέγχου). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (ΣΤ, Η) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης της AKT (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής προς την έκφραση της ολικής πρωτεΐνης) απουσία (DMSO δείγματα) ή παρουσία του αναστολέα LY για 1h (ΣΤ) και 24h (Η). Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (p-) και ολικής μορφής της AKT για την εκάστοτε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (p-) μορφής της AKT κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα από ένα (Δ-E) ή δύο (Α-Γ, Ζ) ανεξάρτητα πειράματα με 3 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα (n = 3-6 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τη φωσφορυλίωση της AKT του δείγματος αρνητικού ελέγχου. ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ σε σχέση με το δείγμα "DMSO".

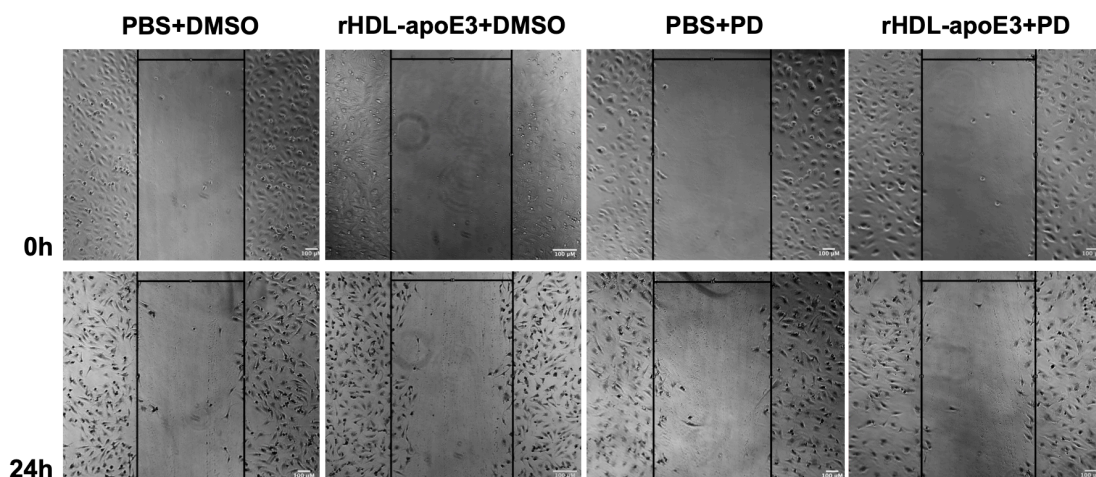
4.12.2. Η rHDL-αροΕ3 επάγει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μέσω των μονοπατιών MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών

Επόμενος στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της συμβολής του καθενός από τα μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-αροΕ3 σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο και βαθμό ενεργοποίησης στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων με τη χρήση ειδικών χημικών αναστολέων. Συγκεκριμένα, εστιαστήκαμε στα τρία μονοπάτια κυτταρικής μετανάστευσης που παρουσίασαν τις περισσότερες αλλαγές σε επίπεδο γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης μετά από επώαση των πρωτογενών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων με την rHDL-αροΕ3, MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών (Ενότητες 4.6.2, 4.7, 4.8) (Πίνακες 4.2 και 4.7) (Εικόνες 4.20-4.23, 4.34-4.35). Για τη μελέτη του ρόλου του μονοπατιού MEK/ERK χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας PD98059 (PD). Ο αναστολέας αυτός

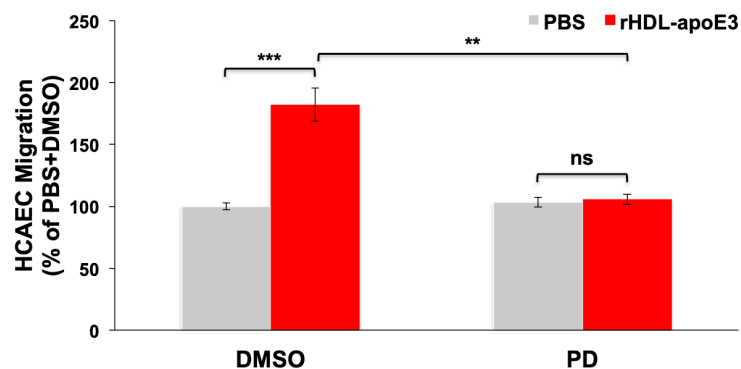
καταστέλλει ειδικά την ενεργοποίηση των κινασών MEK1/2, οι οποίες ενεργοποιούν καθοδικά τις κινάσες-τελεστές της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων ERK1/2 μέσω φωσφορυλίωσης στα αμονοξικά κατάλοιπα Tyr204/187 και Thr202/185 [489]. Εφαρμόστηκαν δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (100 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα PD (2 µM) για 24h (Εικόνα 4.44A). Ο αναστολέας PD μείωσε την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων κατά 42,04% ($P = 0,0028$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.44B). Παρουσία του αναστολέα PD, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μετανάστευση μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν με rHDL-apoE3 και του δείγματος αναφοράς PBS (Εικόνα 4.44B). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο αναστολέας PD εμποδίζει την επαγωγή της μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων από την rHDL-apoE3 και επαναφέρει την κυτταρική μετανάστευση στα ενδογενή (PBS) επίπεδα. Δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μετανάστευση μεταξύ των κυττάρων που εκτέθηκαν σε PBS παρουσία του αναστολέα PD και του δείγματος αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.44B). Συνεπώς, ο αναστολέας PD δεν επηρεάζει την ενδογενή μετανάστευση των HCAEC κυττάρων.

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των MEK1/2 και καθοδικής φωσφορυλίωσης των ERK1/2 κινασών.

A. HCAEC



B.



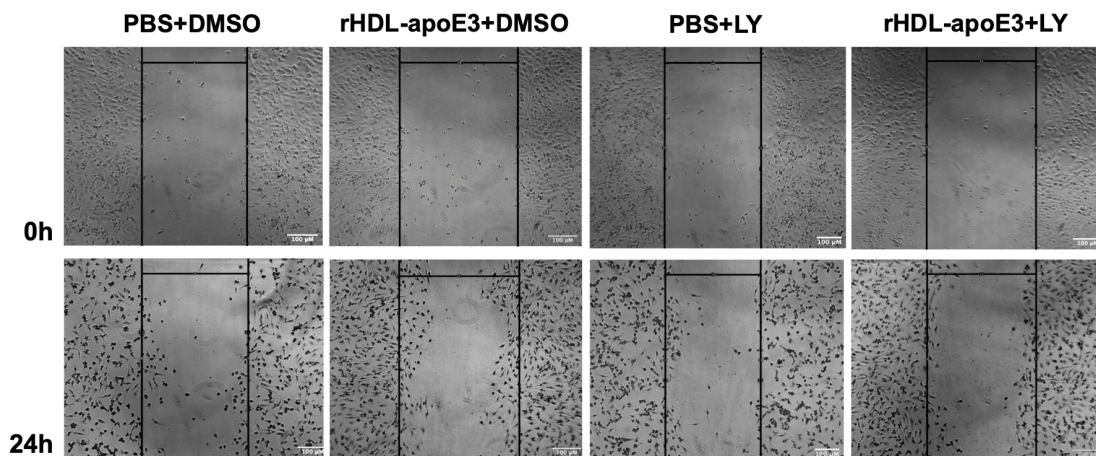
Εικόνα 4.44: Η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των MEK1/2 κινασών. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίας των HCAEC κυττάρων μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (100 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 24h απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα PD98059 (PD) (αναστολέας των MEK1/2 κινασών) (2 µM) στη δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία 0h και 24h μετά τη χορήγηση της εκάστοτε θεραπείας. Οι μαύρες κάθετες γραμμές οριοθετούν την περιοχή της «πληγής». Scale bar 100 µm. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων στην περιοχή της «πληγής» μετά από 24h επώασης με την εκάστοτε θεραπεία απουσία ή παρουσία του αναστολέα PD. Τα αποτελέσματα για κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως ποσοστό % ως προς την κυτταρική μετανάστευση του δείγματος αναφοράς “PBS+DMSO”. ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, ns = μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P > 0,05$).

Για τη μελέτη του ρόλου των μονοπατιών PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας LY294002 (LY). Ο αναστολέας αυτός καταστέλλει ειδικά την ενεργοποίηση της PI3K κινάσης, η οποία δρα ως ο κύριος άμεσος ενεργοποιητής της AKT κινάσης μέσω φωσφορυλίωσης στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser473 και Thr308 [490]. Επιπλέον, η PI3K κινάση μπορεί να ενεργοποιήσει έμμεσα την eNOS μέσω της AKT, η οποία επάγει τη φωσφορυλίωση της eNOS στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser1179 [491]. Η PI3K κινάση μπορεί να δράσει, επίσης, ως έμμεσος ενεργοποιητής της κινάσης p38 MAPK μέσω της RAC1-GTPάσης. Η RAC1-GTPάση ενεργοποιείται από την PI3K και με τη σειρά της ενεργοποιεί καθοδικά την p38 MAPK μέσω φωσφορυλίωσης στα αμινοξικά κατάλοιπα Thr180 and Tyr182 [198] [209] [492-494]. Εφαρμόστηκαν δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-αροΕ3 (100 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα LY (1 μM) για 24h (Εικόνα 4.45A). Η επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μειώθηκε κατά 43,28% ($P < 0,0001$) παρουσία του αναστολέα LY σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.45B). Η rHDL-αροΕ3 αύξησε τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων κατά 102,33% ($P < 0,0001$) απουσία του αναστολέα LY, αλλά μόνο κατά 16,74% ($P = 0,0098$) παρουσία του αναστολέα, συγκριτικά με το PBS (Εικόνα 4.45B). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο αναστολέας LY μειώνει σημαντικά την επαγωγή της μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων από την rHDL-αροΕ3, με αποτέλεσμα η κυτταρική μετανάστευση να προσεγγίζει τα ενδογενή (PBS) επίπεδα. Δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μετανάστευση των κυττάρων που εκτέθηκαν σε PBS παρουσία του αναστολέα LY σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.45B). Συνεπώς, ο LY δεν επηρεάζει την ενδογενή μετανάστευση των HCAEC κυττάρων.

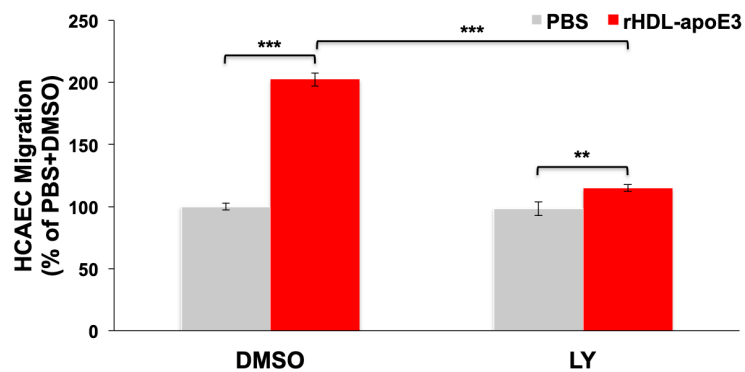
Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η rHDL-αροΕ3 επάγει μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της PI3K κινάσης και καθοδικής φωσφορυλίωσης των σηματοδοτικών μορίων (τελεστών)-στόχων της.

Συμπερασματικά, τα συνολικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα μονοπάτια MEK/ERK, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών εμπλέκονται άμεσα στην επαγωγή της μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων από την rHDL-αροΕ3.

A. HCAEC

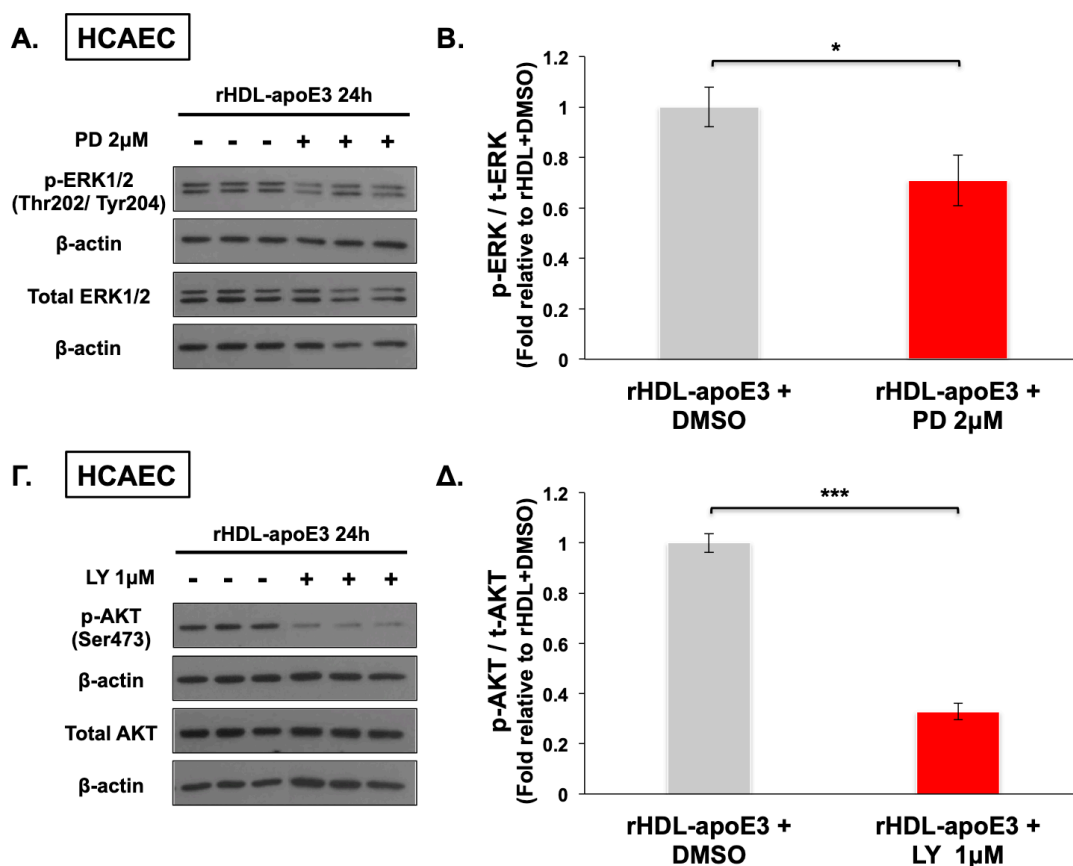


B.



Εικόνα 4.45: Η rHDL-apoE3 αυξάνει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της PI3K κινάσης. Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίας των HCAEC κυττάρων μετά από έκθεση σε rHDL-apoE3 (100 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 24h απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα LY294002 (LY) (αναστολέας της PI3K κινάσης) (1 μM) στη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία 0h και 24h μετά τη χορήγηση της εκάστοτε θεραπείας. Οι μαύρες κάθετες γραμμές οριοθετούν την περιοχή της «πληγής». Scale bar 100μm. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων στην περιοχή της «πληγής» μετά από 24h επώασης με την εκάστοτε θεραπεία απουσία ή παρουσία του αναστολέα LY. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα από δύο ανεξάρτητα πειράματα με 3 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα (n = 6 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως ποσοστό % ως προς την κυτταρική μετανάστευση του δείγματος αναφοράς “PBS+DMSO”. ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Πριν την πραγματοποίηση των δοκιμασιών κυτταρικής μετάναστευσης στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-apoE3 για 24h απουσία ή παρουσία του αναστολέα PD (2 μ M) ή LY (1 μ M) είχε αξιολογηθεί η λειτουργικότητα του εκάστοτε αναστολέα στα κύτταρα αυτά μέσω μέτρησης της ενεργοποίησης των κινασών MEK1/2 και AKT, αντίστοιχα, με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western (Εικόνα 4.46A, Γ). Η αποτελεσματική δράση του αναστολέα PD (2 μ M) στα HCAEC κύτταρα υπό έκθεση σε rHDL-apoE3 (100 μ g/ml) για 24h επιβεβαιώθηκε μέσω μείωσης της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 κατά 29,06% ($P = 0,0043$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.46B). Αντίστοιχα, η αποτελεσματική δράση του αναστολέα LY (1 μ M) στα HCAEC κύτταρα υπό επώαση με rHDL-apoE3 (100 μ g/ml) για 24h επιβεβαιώθηκε μέσω μείωσης της φωσφορυλίωσης της AKT κατά 67,25% ($P < 0,0001$) συγκριτικά με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.46Δ).



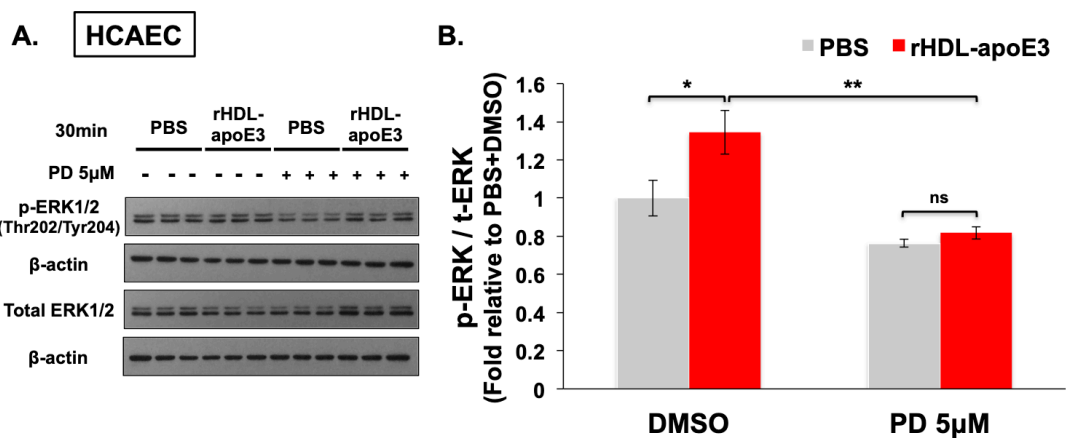
Εικόνα 4.46: Ο αναστολέας των MEK1/2 κινασών PD98059 (PD) μειώνει τη φωσφορυλίωση των ERK1/2 στα HCAEC κύτταρα υπό επώαση με rHDL-apoE3 για 24h, ενώ αναστολέας της PI3K κινάσης LY294002 (LY) μειώνει τη φωσφορυλίωση της AKT στα κύτταρα αυτά. Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των κινασών ERK1/2 (A) και AKT (Γ) με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από

έκθεση σε/επώαση με rHDL-apoE3 (100 µg/ml) για 24h απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα PD (2 µM) (Α) ή LY (1µM) (Γ). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (Β, Δ) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων των φωσφορυλιωμένων μορφών προς την έκφραση της ολικής πρωτεΐνης) των ERK1/2 (Β) και AKT (Δ) για την εκάστοτε θεραπεία. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών (t-) μορφών της εκάστοτε κινάσης για την κάθε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) μορφών των ERK1/2 και AKT κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της εκάστοτε ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε κινάση σε κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τη φωσφορυλίωση του δείγματος "rHDL-apoE3+DMSO". * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0.001$.

4.12.3. Η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τις κινάσες ERK1/2, AKT και p38 MAPK στα HCAEC κύτταρα καθοδικά των MEK1/2 και PI3K, αντίστοιχα, ενώ η ενεργοποίηση της eNOS διεξάγεται ανεξάρτητα της PI3K

Επόμενος στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μορίων-τελεστών της κυτταρικής μετανάστευσης ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνες 4.36-4.37) διεξάγεται μέσω των αντίστοιχων μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών. Για τη μελέτη του ρόλου των MEK1/2 κινασών στην επαγόμενη από την rHDL-apoE3 ενεργοποίηση των ERK1/2 κινασών στα HCAEC κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας PD, ο οποίος καταστέλλει την ενεργοποίηση των MEK1/2 που αποτελούν τον κύριο άμεσο ενεργοποιητή των ERK1/2 κινασών [489]. HCAEC κύτταρα προεπώαστηκαν (1h) απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα PD (5µM), και κατόπιν επώαστηκαν με rHDL-apoE3 (100 µg/ml) ή PBS για επιπλέον 30min (Εικόνα 4.47A). Ο αναστολέας PD μείωσε την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών στα HCAEC κύτταρα κατά 39,25% ($P = 0,0058$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.47B). Παρουσία του αναστολέα PD, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με rHDL-apoE3 και του δείγματος αναφοράς PBS, και ως τούτου εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα ERK1/2 φωσφορυλίωσης (Εικόνα 4.47B). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο αναστολέας PD εμποδίζει την επαγόμενη από την rHDL-apoE3

ενεργοποίηση των ERK1/2 κινασών στα HCAEC κύτταρα, και επαναφέρει τη φωσφορυλίωση των κινασών αυτών στα ενδογενή (PBS) επίπεδα.



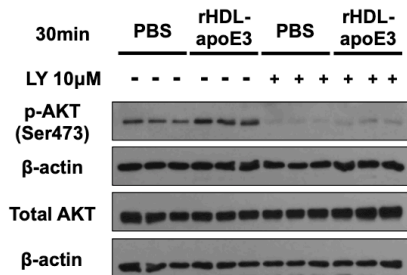
Εικόνα 4.47: Η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τις κινάσες ERK1/2 καθοδικά των MEK1/2 κινασών στα HCAEC κύτταρα. (A) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των ERK1/2 με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (100 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 30min απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα PD98059 (PD) (αναστολέας των MEK1/2) (5μM). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων των φωσφορυλιωμένων μορφών προς την έκφραση της ολικής πρωτεΐνης) για την εκάστοτε θεραπεία. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των ERK1/2 για την κάθε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) μορφών των ERK1/2 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (n = 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τη φωσφορυλίωση των ERK1/2 του δείγματος αναφοράς “PBS+DMSO”. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, ns = μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P > 0,05$).

Προκειμένου να αξιολογηθεί ο ρόλος της PI3K κινάσης στην επαγόμενη από την rHDL-apoE3 ενεργοποίηση των κινασών AKT, p38 MAPK και eNOS στα HCAEC κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας ενεργοποίησης της PI3K LY. Η PI3K κινάση είναι ο βασικός άμεσος ενεργοποιητής της AKT κινάσης [490]. Επιπλέον, η PI3K μπορεί να ενεργοποιήσει έμμεσα την p38 MAPK και την eNOS, μέσω της RAC1-GTPάσης και της AKT, αντίστοιχα [198] [209] [491-493]. HCAEC κύτταρα προεπώαστηκαν (1h) απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού

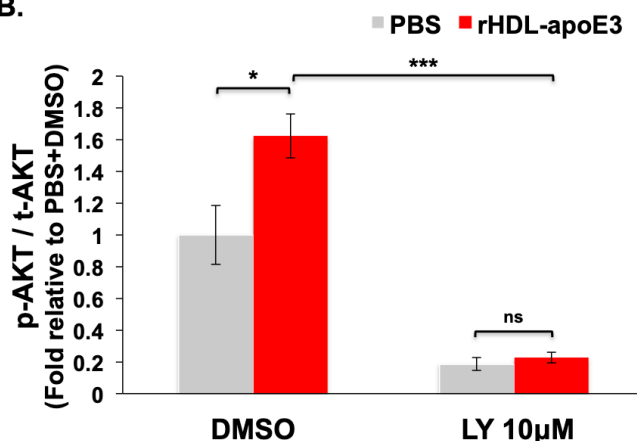
ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα LY (10 μ M και 25 μ M ή 1 μ M), και κατόπιν επώαστηκαν με rHDL-αροΕ3 (100 μ g/ml ή 250 μ g/ml) ή PBS για επιπλέον 30min ή 24h (Εικόνες 4.48A, Γ, 4.49A, Γ). Λόγω των διαφορετικών χρονικών παραθύρων ενεργοποίησης σύμφωνα με την επιστημονική βιβλιογραφία [150] [495, 496], η ενεργοποίηση της AKT αξιολογήθηκε μετά από 30min επώασης των HCAEC κυττάρων με rHDL-αροΕ3 (Εικόνα 4.48A, Γ), ενώ η ενεργοποίηση των κινασών-καθοδικών στόχων της AKT, p38 MAPK και eNOS, μελετήθηκε στις 24h (Εικόνα 4.49A, Γ), κατά αντιστοιχία με όλες τις δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της επούλωσης πληγής (Ενότητα 4.10).

Ο αναστολέας LY σε συγκέντρωση 10 μ M μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 φωσφορυλίωση της AKT στα HCAEC κύτταρα κατά 86,02% ($P = 0,0003$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 3.48B). Ομοίως, η επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 φωσφορυλίωση της AKT στα HCAEC κύτταρα εμποδίστηκε πλήρως κατά 95,79% ($P < 0,0001$) παρουσία του αναστολέα LY σε συγκέντρωση 25 μ M συγκριτικά με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.48Δ). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ένα δόσοεξαρτώμενο τρόπο δράσης του αναστολέα LY στα HCAEC κύτταρα. Παρουσία του αναστολέα LY και στις δύο εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη φωσφορυλίωση της AKT μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με rHDL-αροΕ3 και του δείγματος αναφοράς PBS, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα AKT φωσφορυλίωσης (Εικόνα 4.48B, Δ). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο αναστολέας LY εμποδίζει την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση της AKT στα HCAEC κύτταρα, και επαναφέρει τη φωσφορυλίωση της κινάσης αυτής στα ενδογενή (PBS) επίπεδα.

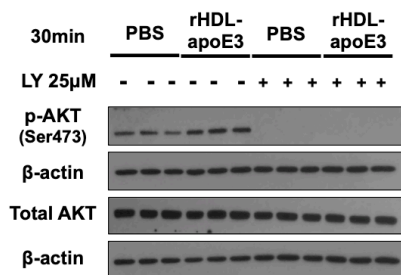
A. HCAEC



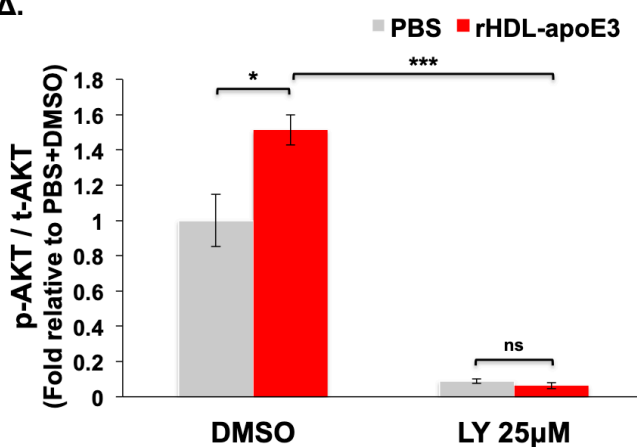
B.



Γ. HCAEC



Δ.



Εικόνα 4.48: Η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί την κινάση AKT καθοδικά της PI3K κινάσης στα HCAEC κύτταρα. (A, Γ) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης (p-) και ολικής μορφής της AKT με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (250 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 30min απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα LY294002 (LY) (αναστολέας της PI3K) σε συγκέντρωση 10 μM (A) ή 25 μM (Γ). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (B, Δ) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης της AKT (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής προς την έκφραση της ολικής πρωτεΐνης) για την εκάστοτε θεραπεία απουσία (DMSO) ή παρουσία του LY 10 μM (B) ή 25 μM (Δ). Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (p-) και ολικής (t-) μορφής της AKT για την εκάστοτε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (p-) μορφής της AKT κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή ±

τυπικό σφάλμα ($n = 3$ βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τη φωσφορυλίωση της AKT του δείγματος αναφοράς "PBS+DMSO". * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$, ns = μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P > 0,05$).

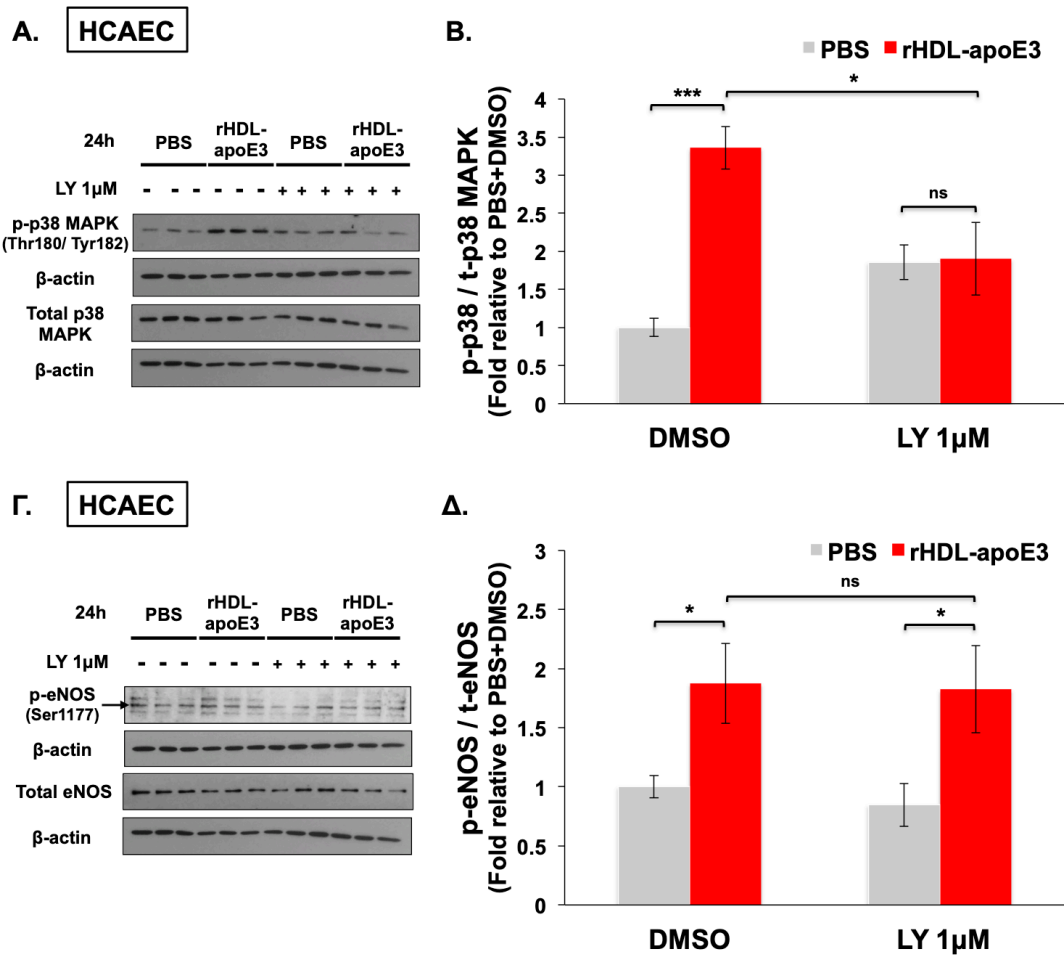
Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για τη δράση του αναστολέα LY στην ενεργοποίηση της p38 MAPK που επάγεται από την rHDL-αροΕ3 στα HCAEC κύτταρα (Εικόνα 4.49Α). Ο αναστολέας LY μείωσε την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 φωσφορυλίωση της p38 MAPK στα HCAEC κύτταρα κατά 43,31% ($P = 0,0294$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.49Β). Παρουσία του αναστολέα LY, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη φωσφορυλίωση της p38 MAPK μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με rHDL-αροΕ3 και του δείγματος αναφοράς PBS, και ως εκ τούτου εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα p38 MAPK φωσφορυλίωσης (Εικόνα 4.49Β). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο αναστολέας LY εμποδίζει την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση της p38 MAPK στα HCAEC κύτταρα, και επαναφέρει τη φωσφορυλίωση της κινάσης αυτής στα ενδογενή (PBS) επίπεδα.

Αντίθετα, ο αναστολέας LY δεν επηρέασε την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση της eNOS στα HCAEC κύτταρα (Εικόνα 4.49Γ). Ειδικότερα, η rHDL-αροΕ3 αύξησε τη φωσφορυλίωση της eNOS τόσο απουσία (DMSO) όσο και παρουσία του αναστολέα LY, συγκριτικά με το PBS (87,51% ($P = 0,034$) και 115,45% ($P = 0,038$), αντίστοιχα) (Εικόνα 4.49Δ). Ως εκ τούτου, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 φωσφορυλίωση της eNOS μεταξύ των κυττάρων παρουσία του αναστολέα LY και του δείγματος αρνητικού ελέγχου DMSO (Εικόνα 4.49Δ). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ένας μηχανισμός ανεξάρτητος της ενεργοποίησης της PI3K κινάσης εμπλέκεται στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση της eNOS στα HCAEC κύτταρα.

Συμπερασματικά, τα συνολικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι η rHDL-αροΕ3 ενεργοποιεί τις κινάσες ERK1/2, AKT και p38 MAPK μέσω των κινασών MEK1/2 και PI3K, αντίστοιχα, στα HCAEC κύτταρα. Αντίθετα, η rHDL-αροΕ3 ενεργοποιεί την eNOS στα κύτταρα αυτά μέσω ενός μηχανισμού που είναι ανεξάρτητος της PI3K κινάσης.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα των Ενοτήτων 4.12.2 και 4.12.3 υποδηλώνουν ότι η rHDL-αροΕ3 επάγει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των κινασών MEK1/2

και PI3K και επακόλουθης φωσφορυλίωσης των καθοδικών κινασών-στόχων τους ERK1/2, AKT και p38 MAPK, αντίστοιχα.



Εικόνα 4.49: Η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί την κινάση p38 MAPK μέσω της PI3K κινάσης στα HCAEC κύτταρα, ενώ η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 ενεργοποίηση της eNOS είναι ανεξάρτητη της PI3K. (Α, Γ) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των p38 MAPK (Α) και eNOS (Γ) με ανοσοαποτύπωση western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-apoE3 (100 μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 24h απουσία (DMSO δείγματα αρνητικού ελέγχου) ή παρουσία του αναστολέα LY294002 (LY) (αναστολέας της PI3K) (1μM). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (Β, Δ) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής προς την έκφραση της ολικής πρωτεΐνης) της p38 MAPK (Β) και της eNOS (Δ) για την εκάστοτε θεραπεία. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών (t-) μορφών της εκάστοτε πρωτεΐνης για την κάθε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (p-) μορφής

του κάθε μορίου κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της εκάστοτε ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε πρωτεΐνη σε κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα ($n = 3$ βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τη φωσφορυλίωση του δείγματος αναφοράς "PBS+DMSO". (Δ) Η ζώνη που αντιστοιχεί στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης eNOS (p-eNOS) σημειώνεται με βέλος (140kDa). Η ζώνη στα 160kDa αντιπροσωπεύει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ισομορφής nNOS, ενώ η ζώνη των 130kDa αντιστοιχεί στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ισομορφής iNOS. * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$, ns = μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P > 0,05$).

Πριν την πραγματοποίηση των αναλύσεων ανοσοαποτύπωσης western στα HCAEC κύτταρα μετά από επώαση με rHDL-apoE3 για 30min ή 24h απουσία ή παρουσία του αναστολέα PD (5 μ M) ή LY (10 μ M και 25 μ M ή 1 μ M) είχε αξιολογηθεί η λειτουργικότητα του εκάστοτε αναστολέα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις τη χρονική στιγμή χορήγησης της rHDL-apoE3 (η οποία αντιστοιχεί στην 1h προεπώασης των κυττάρων με τον αναστολέα). Ειδικότερα, η αποτελεσματική δράση του αναστολέα PD (5 μ M) τη χρονική στιγμή της χορήγησης rHDL-apoE3 είχε επιβεβαιωθεί σε προηγούμενα πειράματα μέσω μείωσης της φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών στα HCAEC κύτταρα σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Ενότητα 4.12.1) (Εικόνα 4.42A-B). Αντίστοιχα, αποτελεσματική δράση του αναστολέα LY (1 μ M, 10 μ M και 25 μ M) τη χρονική στιγμή χορήγησης της rHDL-apoE3 είχε επιβεβαιωθεί σε προηγούμενα πειράματα μέσω μείωσης της φωσφορυλίωση της AKT στα HCAEC κύτταρα συγκριτικά με το δείγμα αρνητικού ελέγχου DMSO (Ενότητα 4.12.1) (Εικόνα 4.43A-Γ, ΣΤ).

4.13. Ταυτοποίηση γονιδίων-κλειδιών μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης και επάγει μετανάστευση στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα

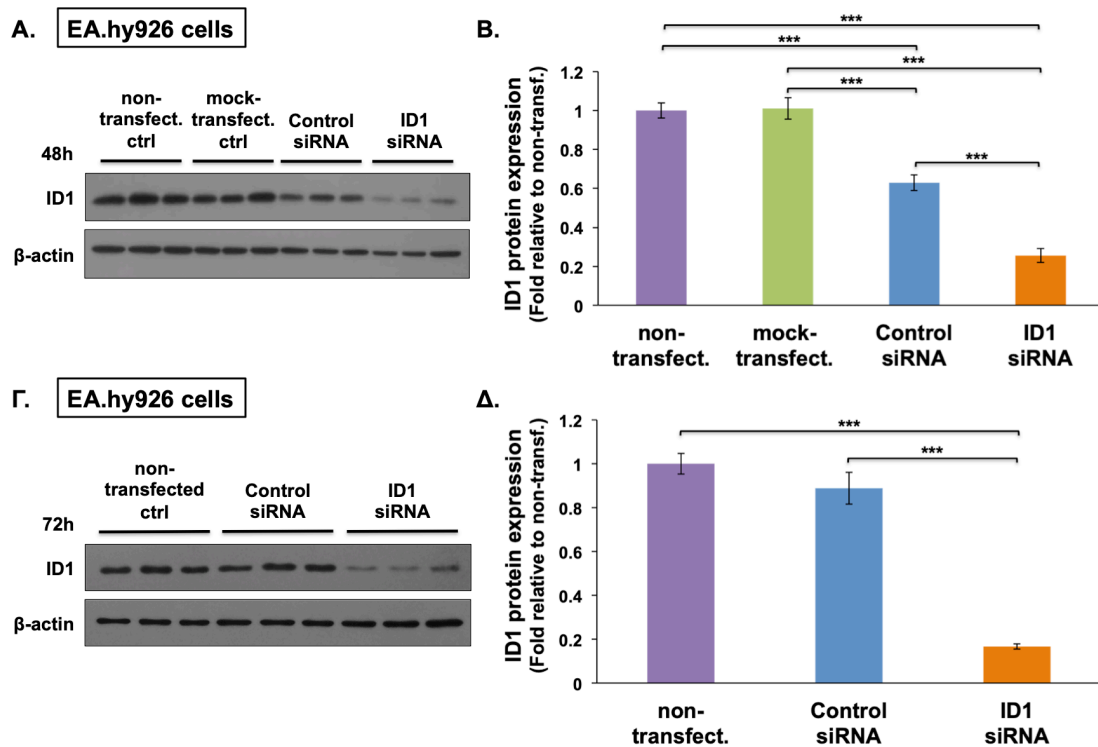
4.13.1. Πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης των γονιδίων ID1 και EFNB2 στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα

Επόμενος στόχος της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός γονιδίων-ρυθμιστών μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγει επακόλουθα τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Εστιαστήκαμε στη μελέτη των γονιδίων EFNB2 και ID1 επειδή παίζουν κεντρικό ρόλο και στα τρία προαναφερόμενα μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που ενεργοποιούνται από την rHDL-apoE3

(Ενότητα 4.6.2) (Πίνακας 4.2) (Εικόνες 4.15, 4.20-4.23), και επιπλέον επειδή υπερεκφράζονται (σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης) και τα ίδια μετά από επώαση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων με την rHDL-apoE3 (Ενότητες 4.6.2, 4.7, 4.8) (Πίνακες 4.2 και 4.7) (Εικόνες 4.34-4.35). Το γονίδιο ID1 κωδικοποιεί για το μεταγραφικό παράγοντα ID1 και το γονίδιο EFNB2 για τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη εφρίνη Β2, τα οποία επάγουν μετανάστευση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ποικίλων μοριακών μηχανισμών [497-502]. Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των EFNB2 και ID1 στην επαγόμενη από την rHDL-apoE3 μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 ή της EFNB2 μέσω ενός ειδικού siRNA για το εκάστοτε γονίδιο (ID1 siRNA και EFNB2 siRNA, αντίστοιχα) στα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα. Κύτταρα που επιμολύνθηκαν με ένα siRNA τυχαίας ακολουθίας (Control siRNA) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα αρνητικού ελέγχου. Κύτταρα που δεν επιμολύνθηκαν με siRNA (μη επιμολυσμένα κύτταρα ή “non-transfected control”) και mock κύτταρα (εικονικά επιμολυσμένα κύτταρα ή “mock-transfected control”) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου της ενδογενούς έκφρασης του εκάστοτε υπό μελέτη γονιδίου. Εξετάστηκαν ένα εύρος συγκεντρώσεων του ID1 siRNA ή του EFNB2 siRNA, διαφορετικοί χρόνοι επώασης των HCAEC ή/και EA.hy926 κυττάρων με αυτά (24h, 48h, 72h) και διαφορετικά αντιδραστήρια επιμόλυνσης siRNA. Εφαρμόστηκαν ένας ή δύο κύκλοι επιμόλυνσης (συμβατική ή αντίστροφη επιμόλυνση) των HCAEC ή/και EA.hy926 κυττάρων με το ID1 siRNA ή το EFNB2 siRNA (Ενότητα 3.29.1). Δεν παρατηρήθηκε μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της EFNB2 σε καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις και σε κανένα από τα χρονικά διαστήματα και αντιδραστήρια επιμόλυνσης που εφαρμόστηκαν (αναφέρονται λεπτομερώς στην Ενότητα 3.29.1) στις διάφορες μεθόδους επιμόλυνσης των HCAEC κυττάρων με το EFNB2 siRNA συγκριτικά με την ομάδα αρνητικού ελέγχου. Ως εκ τούτου, δε μελετήθηκε περαιτέρω ο ρόλος της EFNB2 στην επαγόμενη από την rHDL-apoE3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων. Αντίθετα, η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 ήταν επιτυχής σε καθορισμένες πειραματικές συνθήκες που περιγράφονται παρακάτω. Ειδικότερα, τα EA.hy926 κύτταρα εμφάνισαν υψηλότερη αποτελεσματικότητα γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 σε σχέση με τα HCAEC κύτταρα, όπως προέκυψε από αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western για τη μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με την επιστημονική βιβλιογραφία, με βάση την οποία τα πρωτογενή ενδοθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν χαμηλή αποτελεσματικότητα γονιδιακής αποσιώπησης μέσω siRNA επιμόλυνσης. Η μεγάλη ανθεκτικότητα των πρωτογενών ενδοθηλιακών κυττάρων στην επιμόλυνση με siRNA οφείλεται, μεταξύ άλλων παραγόντων,

στη σύσταση της πλασματικής τους μεμβράνης [503, 504]. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, τα EA.hy926 κύτταρα επιλέχθηκαν για την εφαρμογή των περαιτέρω πειραμάτων γονιδιακής αποσιώπησης του ID1.

Η γονιδιακή αποσίωπηση του ID1 επιτεύχθηκε εφαρμόζοντας δύο κύκλους επιμόλυνσης των EA.hy926 κυττάρων με το ID1 siRNA (50 nM) μέσω της λιποφεκταμίνης RNAiMAX μετά από 48h και 72h από τον πρώτο κύκλο επιμόλυνσης. Αρχικά τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αντίστροφη επιμόλυνση με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (50 nM) για 24h, και κατόπιν επιμολύνθηκαν εκ νέου για επιπλέον 24h ή 48h (48h ή 72h συνολικός χρόνος επιμόλυνσης, αντίστοιχα) (Ενότητα 3.29.2). Εφαρμόστηκαν αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων αυτών για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 48h και 72h μετά την επιμόλυνση (Εικόνα 4.50A, Γ). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ID1 μειώθηκαν στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA για 48h σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου και τα μη επιμολυσμένα κύτταρα (59,43% και 74,49%, αντίστοιχα, $P < 0.0001$) (Εικόνα 4.50B). Η επιμόλυνση των κυττάρων με το ID1 siRNA για 72h οδήγησε, επίσης, σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 συγκριτικά με το δείγμα αρνητικού ελέγχου και τα μη επιμολυσμένα κύτταρα (81,26% και 83,35%, αντίστοιχα, $P < 0.0001$) (Εικόνα 4.50Δ). Συνεπώς, στις 72h επιμόλυνσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ID1 στα EA.hy926 κύτταρα σε σχέση με τις 48h, και επομένως υψηλότερη αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης του ID1.



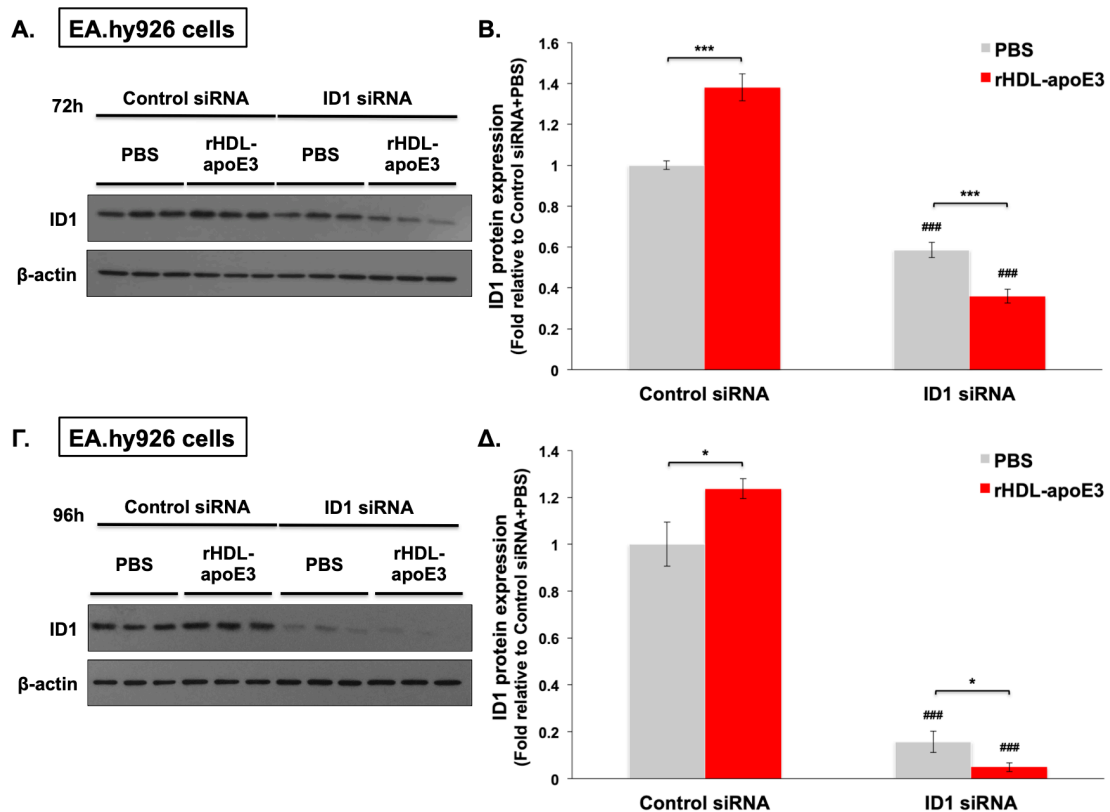
Εικόνα 4.50: Η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 μέσω ID1 siRNA μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ID1 στα EA.hy926 κύτταρα. (Α, Γ) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ID1 με ανοσοαποτύπωση western στα EA.hy926 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (Control siRNA, κύτταρα αρνητικού ελέγχου) για 48h (Α) ή 72h (Γ) ή στα μη επιμολυσμένα (“non-transfected”) ή εικονικά-επιμολυσμένα (“mock-transfected”) κύτταρα (δείγματα ελέγχου της ενδογενούς έκφρασης του ID1). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (Β, Δ) Ραβδόγραμμα απεικόνισης των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 στα EA.hy926 κύτταρα 48h (Β) και 72h (Δ) μετά την επιμόλυνση ή στα μη επιμολυσμένα και mock-επιμολυσμένα κύτταρα, τα οποία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα από δύο ανεξάρτητα πειράματα με 3 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα (n = 6 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ID1 του δείγματος “μη επιμολυσμένα κύτταρα”. *** $P \leq 0,001$.

4.13.2. Η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 εμποδίζει την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 στα EA.hy926 κύτταρα

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης, αξιολογήθηκε η επίδραση της ταυτόχρονης επιμόλυνσης των EA.hy926 κυττάρων με το ID1 siRNA για 72h ή 96h και της επώασης με rHDL-αροΕ3 για 24h στην πρωτεϊνική έκφραση του ID1. Ειδικότερα, EA.hy926 κύτταρα επιμολύνθηκαν με το

ID1 siRNA (50nM) ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (δείγμα αρνητικού ελέγχου) για 48h ή 72h, και κατόπιν επωάστηκαν με rHDL-apoE3 (100 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για επιπλέον 24h (δηλαδή, συνολικός χρόνος επιμόλυνσης 72h ή 96h, αντίστοιχα). Εφαρμόστηκαν αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης western στα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα για τη μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 (Εικόνα 4.37A, Γ). Η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 στα EA.hy926 κύτταρα στα χρονικά σημεία επιμόλυνσης 48h και 72h που αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή της χορήγησης rHDL-apoE3 ή PBS είχε επιβεβαιωθεί σε προηγούμενα πειράματα (Ενότητα 4.13.1) (Εικόνα 4.50). Παρουσία του ID1 siRNA μειώθηκε η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου, τόσο στις 72h όσο και στις 96h μετά την επιμόλυνση (73,99% και 96,04%, αντίστοιχα, $P < 0.0001$) (Εικόνα 4.51B, Δ). Η rHDL-apoE3 αύξησε την πρωτεϊνική έκφραση του ID1 συγκριτικά με το PBS στα κύτταρα αρνητικού ελέγχου, τόσο στις 72h (38,16%, $P < 0,0001$) όσο και στις 96h (23,72%, $P = 0,0414$) (Εικόνα 4.51B, Δ). Ωστόσο, παρουσία του ID1 siRNA, μειώθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ID1 στα κύτταρα που επωάστηκαν με την rHDL-apoE3 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς PBS, τόσο στις 72h (38,62% $P = 0,0004$ και 68,80% $P = 0,0462$, αντίστοιχα) (Εικόνα 4.51B, Δ).

Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ID1 εμποδίζεται στα EA.hy926 κύτταρα 72h και 96h μετά την επιμόλυνση με το ID1 siRNA, με την υψηλότερη αποτελεσματικότητα γονιδιακής αποσιώπησης να επιτυγχάνεται στις 96h.

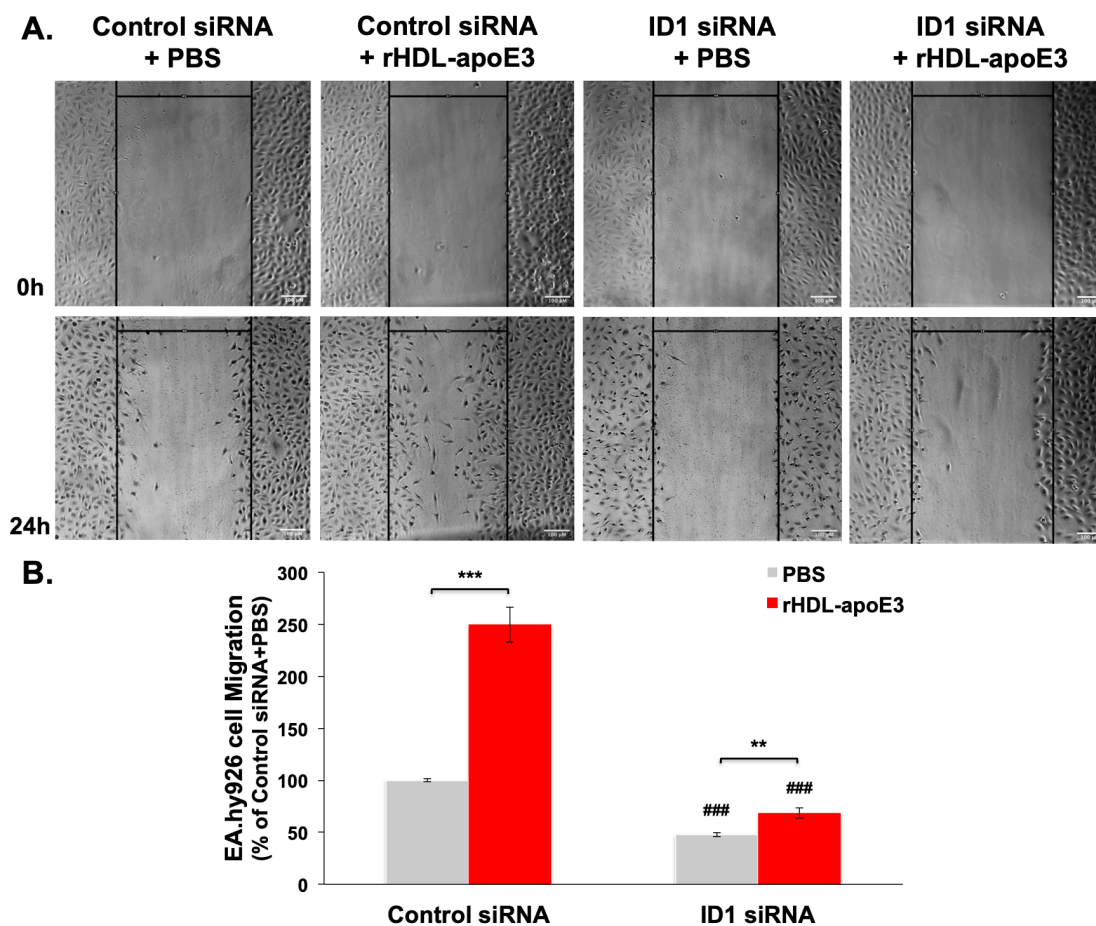


Εικόνα 4.51: Η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 μέσω ID1 siRNA εμποδίζει την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 που επάγεται από την rHDL-apoE3 στα EA.hy926 κύτταρα. (Α, Γ) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ID1 με ανοσοαποτύπωση western στα EA.hy926 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (Control siRNA, δείγμα αρνητικού ελέγχου) για 48h (Α) ή 72h (Γ), και κατόπιν επωάστηκαν με rHDL-apoE3 ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 24h (συνολικός χρόνος επιμόλυνσης 72h ή 96h, αντίστοιχα). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (Β, Δ) Ραβδόγραμμα απεικόνισης των πρωτεϊνικών επιπέδων του ID1 για την εκάστοτε θεραπεία 72h (Β) και 96h (Δ) μετά τη επιμόλυνση, τα οποία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα από ένα (96h, Δ) ή δύο (72h, Β) ανεξάρτητα πειράματα με 3 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα (n = 3-6 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ID1 του δείγματος αναφοράς “siRNA τυχαίας ακολουθίας+PBS”. * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$, και ### $P \leq 0,001$ μεταξύ των επιμολυσμένων κυττάρων με το ID1 siRNA και του δείγματος αρνητικού ελέγχου (Control siRNA).

4.13.3. Η rHDL-αρoE3 επάγει τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων μέσω υπερέκφρασης του ID1

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της ενδογενούς έκφρασης του ID1 στην επαγόμενη από την rHDL-αρoE3 μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, εφαρμόστηκαν δοκιμασίες κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» σε EA.hy926 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (δείγμα αρνητικού ελέγχου) για 72h, και κατόπιν επώαστηκαν με rHDL-αρoE3 (100μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 24h (συνολικός χρόνος επιμόλυνσης 96h) (Εικόνα 4.52A). Η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 στα EA.hy926 κύτταρα 72h και 96h μετά την επιμόλυνση που αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία 0h και 24h επώασης με την rHDL-αρoE3 ή το PBS, αντίστοιχα, είχε επιβεβαιωθεί σε προηγούμενα πειράματα (Ενότητες 4.13.1-4.13.2) (Εικόνες 4.50Γ-Δ, 4.51Γ-Δ). Η επιμόλυνση των κυττάρων με το ID1 siRNA μείωσε την επαγόμενη από την rHDL-αρoE3 κυτταρική μετανάστευση κατά 72,56% ($P < 0,0001$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου. Η rHDL-αρoE3 αύξησε τη μετανάστευση κατά 149,63% ($P < 0,0001$) στο δείγμα αρνητικού ελέγχου, αλλά μόνο κατά 43,74% ($P = 0,0051$) στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA, σε σχέση με το PBS (Εικόνα 4.52B).

Συμπερασματικά, η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 μείωσε σημαντικά τη μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων που επάγεται από την rHDL-αρoE3. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο ID1 παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της μετανάστευσης των EA.hy926 κυττάρων από την rHDL-αρoE3, αναδεικνύοντας τον ID1 ως έναν κύριο ρυθμιστή της επαγόμενης από την rHDL-αρoE3 μετανάστευσης στα κύτταρα αυτά.



Εικόνα 4.52: Η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 μέσω ID1 siRNA μειώνει την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 μετανάστευση των EA.hy926 κυττάρων. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίας των EA.hy926 κυττάρων που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (Control siRNA, δείγμα αρνητικού ελέγχου) για 72h, και κατόπιν επώστηκαν με rHDL-apoE3 (100μg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 24h στη δοκιμασία προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής». Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία 0h και 24h μετά τη χορήγηση της εκάστοτε θεραπείας. Οι μαύρες κάθετες γραμμές οριοθετούν την περιοχή της «πληγής». Scale bar 100μm. (B) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μετανάστευσης των επιμολυσμένων EA.hy926 κυττάρων στην περιοχή της «πληγής» μετά από 24h επώασης με την εκάστοτε θεραπεία. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα από τρία ανεξάρτητα πειράματα με 3 βιολογικές επαναλήψεις για την εκάστοτε θεραπεία σε κάθε πείραμα (n = 9 βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και υπολογίζονται ως ποσοστό % ως προς την κυτταρική μετανάστευση του δείγματος αναφοράς “siRNA τυχαίας ακολουθίας+PBS”. ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, και ### $P \leq 0,001$ μεταξύ των επιμολυσμένων κυττάρων με το ID1 siRNA και του δείγματος αρνητικού ελέγχου (Control siRNA).

4.13.4. Ο ID1 εμπλέκεται στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση των μονοπατιών μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών στα EA.hy926 κύτταρα

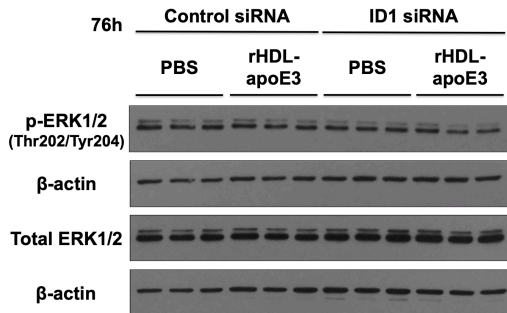
Η υπερέκφραση του ID1 έχει δειχθεί ότι επάγει την ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2 και AKT μέσω φωσφορυλίωσης των MEK1/2 and PI3K, αντίστοιχα [499] [505]. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν ο ID1 είναι υπεύθυνος για την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση των ERK1/2 και AKT στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (Ενότητα 4.9) (Εικόνες 4.36-4.37), μετρήθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των κινασών αυτών στα EA.hy926 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (δείγμα αρνητικού ελέγχου) για 76h, και κατόπιν επώαστηκαν με rHDL-αροΕ3 (100 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) για 30min (Εικόνα 4.53Α, Γ). Η επιμόλυνση των κυττάρων με το ID1 siRNA μείωσε την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 φωσφορυλίωση των ERK1/2 κατά 44,78% ($P = 0,0011$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου (Εικόνα 4.53Β). Επιπλέον, παρουσία του ID1 siRNA, μειώθηκε η επαγόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2 από την rHDL-αροΕ3 κατά 21,75% ($P = 0,0179$) συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς PBS. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 εμποδίζει την ενεργοποίηση των ERK1/2 που επάγεται από την rHDL-αροΕ3 στα EA.hy926 κύτταρα, και οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης των κινασών αυτών σε επίπεδα χαμηλότερα από τα ενδογενή (PBS).

Παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν και από την επίδραση της γονιδιακής αποσιώπησης του ID1 στην επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση της AKT στα EA.hy926 κύτταρα (Εικόνα 4.53Γ). Η επιμόλυνση των κυττάρων με το ID1 siRNA μείωσε την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 φωσφορυλίωση της AKT κατά 33,26% ($P = 0,0013$) σε σχέση με το δείγμα αρνητικού ελέγχου (Εικόνα 4.53Δ). Παρουσία του ID1 siRNA, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη φωσφορυλίωση της AKT μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με rHDL-αροΕ3 και του δείγματος αναφοράς PBS, και ως εκ τούτου εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα AKT φωσφορυλίωσης (Εικόνα 4.53Δ). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 εμποδίζει την επαγόμενη από την rHDL-αροΕ3 ενεργοποίηση της AKT στα EA.hy926 κύτταρα, και επαναφέρει τη φωσφορυλίωση της κινάσης αυτής στα ενδογενή (PBS) επίπεδα.

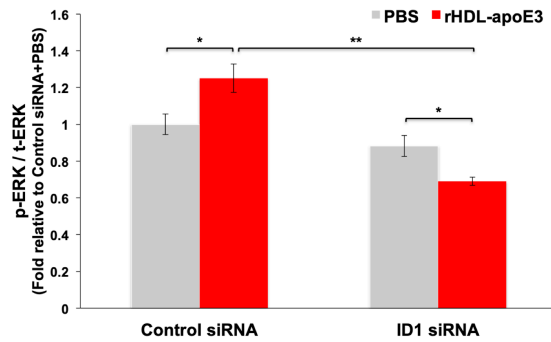
Συμπερασματικά, τα συνολικά ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο ID1 απαιτείται για την ενεργοποίηση των ERK1/2 και AKT κινασών από την rHDL-αροΕ3 στα EA.hy926 κύτταρα, υποστηρίζοντας περαιτέρω ότι η rHDL-αροΕ3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης

MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και RHO-GTPασών μέσω υπερέκφρασης του ID1 στα κύτταρα αυτά. Συνοψίζοντας, τα συνολικά ευρήματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι μέσω αυτών των μηχανισμών η rHDL-αποΕ3 επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου.

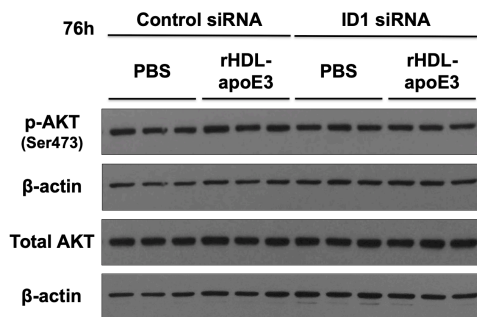
A. EA.hy926 cells



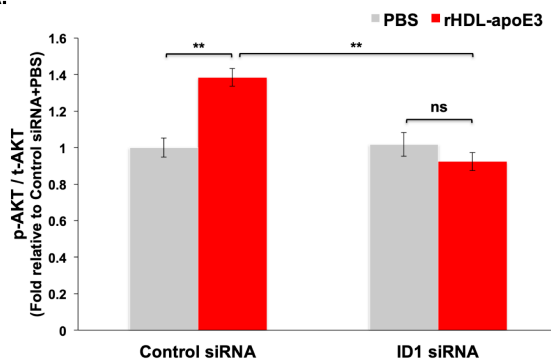
B.



Γ. EA.hy926 cells



Δ.



Εικόνα 4.53: Η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 μέσω siRNA εμποδίζει την επαγόμενη από την rHDL-αποΕ3 ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2 και AKT στα EA.hy926 κύτταρα. (Α, Γ) Αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών μορφών των κινασών ERK1/2 (Α) και AKT (Γ) με ανοσοαποτύπωση western στα EA.hy926 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το ID1 siRNA ή το siRNA τυχαίας ακολουθίας (δείγμα αρνητικού ελέγχου) (76h), και κατόπιν επώαστηκαν με rHDL-αποΕ3 (100 µg/ml) ή PBS (κύτταρα αναφοράς) (30min). Η πρωτεϊνική έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (Β, Δ) Ραβδόγραμμα απεικόνισης της φωσφορυλίωσης (λόγος των πρωτεϊνικών επιπέδων των φωσφορυλιωμένων (p-) μορφών προς την έκφραση της ολικής (t-) πρωτεΐνης) των ERK1/2 (Β) και AKT (Δ) για την εκάστοτε θεραπεία. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) και ολικών (t-) μορφών της κάθε κινάσης για την εκάστοτε θεραπεία κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων (p-) μορφών των ERK1/2 και AKT κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της εκάστοτε ολικής (t-) πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα για την εκάστοτε πρωτεΐνη

σε κάθε θεραπεία υπολογίζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα ($n = 3$ βιολογικές επαναλήψεις ανά θεραπεία) και παρουσιάζονται ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του δείγματος αναφοράς “siRNA τυχαίας ακολουθίας+PBS”. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, ns = μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P > 0,05$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Συζήτηση

Η λειτουργικότητα της HDL είναι ο πρωταρχικός θεραπευτικός στόχος για την ASCAD σε σχέση με τα επίπεδα της HDL-C του πλάσματος. Γενετικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεμονωμένη αύξηση των επιπέδων HDL-C του πλάσματος δεν αρκεί για να την προστασία από την αθηροσκλήρωση αλλά πρέπει να συνοδεύεται από την ύπαρξη λειτουργικής HDL [50] [267]. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με ASCAD φέρουν μη λειτουργική/δυσλειτουργική HDL, η οποία χαρακτηρίζεται από απώλεια των αθηροπροστατευτικών της λειτουργιών και ενδεχομένως προφλεγμονώδεις/προ-αθηρογόνες ιδιότητες [103]. Από τα ευρήματα αυτά προκύπτει ότι η βελτίωση της λειτουργικότητας της HDL είναι καταλληλότερος θεραπευτικός στόχος σε σχέση με τη μεμονωμένη αύξηση των επιπέδων HDL-C στο πλάσμα [50] [267]. Η ερευνητική κοινότητα έχει πλέον εστιαστεί στην ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών που ενισχύουν τη λειτουργικότητα της HDL, αντί να αυξάνουν μεμονωμένα τα επίπεδα της HDL-C του πλάσματος [50] [398].

Η λειτουργικότητα της HDL καθορίζεται από την πρωτεϊνική και λιπιδική της σύσταση, και σχετίζεται με τις ποικίλες αθηροπροστατευτικές της λειτουργίες. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί ώστε να βελτιώνουν τις αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL ενώ παράλληλα αυξάνουν τα επίπεδα της HDL-C του πλάσματος περιλαμβάνουν τις διαφορετικές μορφές της rHDL-apoA-I, οι οποίες αποτελούνται από ανθρώπινη apoA-I και φωσφολιπίδια (MDCO-216, CER-001, CLS-111 και CLS-112) [51] [398]. Όμως, οι διαφορετικές αυτές μορφές της rHDL-apoA-I δεν οδήγησαν σε σημαντική μείωση της αθηροσκλήρωσης και του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ASCAD που υπέστησαν πρόσφατο ACS [51] [423]. Συνεπώς, η ερευνητική κοινότητα πλέον εστιάζεται στο σχεδιασμό νέων μορφών rHDL με βελτιωμένη (απολιπο)πρωτεϊνική ή/και λιπιδική σύσταση και, κατ' επέκταση, ενισχυμένες αθηροπροστατευτικές ιδιότητες [139] [398].

Προς αυτήν την κατεύθυνση, η rHDL-apoE3 μπορεί να αντιπροσωπεύει μία υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση, η οποία παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη [398] [506]. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στις πολυάριθμες αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της apoE3 [108] [507] και σε ευρήματα μελετών που έδειξαν ότι η έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί για την apoE σε ποντίκια και ανθρώπους οδηγεί σε σοβαρή αθηροσκλήρωση, σε αντίθεση με την έλλειψη του γονιδίου της apoA-I [314, 315] [508]. Η προστασία από την αθηροσκλήρωση που παρατηρείται στα apoA-I -/- ποντίκια μπορεί να παρέχεται από τα λειτουργικά HDL σωματίδια που περιέχουν apoE (HDL-apoE) τα οποία βιοσυντίθενται

απουσία της apoA-I (η βιοσύνθεση των οποίων δεν εξαρτάται από την παρουσία της apoA-I) [111] [125]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα σωματίδια αυτά έχουν αθηροπροστατευτικές λειτουργίες, όπως η ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα και οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες [125, 126]. Επιπλέον, η apoE επάγει την ηπατική κάθαρση των αθηρογόνων πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών της κυκλοφορίας [507]. Η ικανότητα της apoE να μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος, μαζί με τις ενισχυμένες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των πεπτιδίων μιμητών της apoE σε σύγκριση με τα πεπτίδια μιμητές της apoA-I μπορεί, επίσης, να συμβάλλουν στη μεγαλύτερη προστασία έναντι της αθηροσκλήρωσης in vivo [314] [320] [456].

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αθηροπροστατευτική προοπτική της rHDL-apoE3 σε κυτταρικό, μοριακό και λειτουργικό επίπεδο. Η διατριβή εστιάστηκε στη μελέτη της επίδρασης της rHDL-apoE3 στη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς η λειτουργία αυτή παίζει κρίσιμο ρόλο στην αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος και στη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας, και κατ' επέκταση συμβάλλει στην προστασία από την αθηροσκλήρωση και στην πρόληψη ανάπτυξης της νόσου [206, 207] [212] [215]. Η διατριβή χαρακτήρισε τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο ID1 αναδείχθηκε ως ο κύριος ρυθμιστής μέσω του οποίου η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης και επάγει επακόλουθα τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, και προσδιορίστηκαν σημαντικά μόρια τελεστές των μονοπατιών αυτών. Μέσω των μηχανισμών αυτών, η rHDL-apoE3 θα μπορούσε ενδεχομένως να επάγει τη διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου και την επανενδοθηλιοποίηση ενός αγγείου με αθηρωματικές αλλοιώσεις.

Ειδικότερα, από την αμερόληπτη και σφαιρική αξιολόγηση των γονιδίων και μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δράση της rHDL-apoE3 στα HAEC κύτταρα, μέσω ανάλυσης του προφίλ ολικής γονιδιακής έκφρασης, προέκυψε ότι η rHDL-apoE3 προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων οι οποίες εμπλέκονται στην αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου και ρυθμίζουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Οι πιο στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένες λειτουργίες στις οποίες κατηγοριοποιήθηκαν οι περισσότερες μεταγραφικές αλλαγές ήταν η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η κάθε μία από τις λειτουργίες αυτές συμβάλλει στη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας του αρτηριακού

τοιχώματος και επάγει την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό [214] [220]. Μέσω αυτών των μηχανισμών, οι εν λόγω λειτουργίες βελτιώνουν ή ακόμη προλαμβάνουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αθηρογένεση, και κατ' επέκταση προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση [6] [22] [24]. Η rHDL-apoE3 προκάλεσε, επίσης, σημαντικές αλλαγές σε μηχανισμούς και λειτουργίες που ρυθμίζουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, όπως η φλεγμονώδης απόκριση, ο μεταβολισμός λιπιδίων, η διακυτταρική σηματοδότηση και επικοινωνία και η κυτταρική σηματοδότηση. Η συσσώρευση λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα επάγει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του έσω χιτώνα, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1. Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου επάγει τη φλεγμονώδη απόκριση, καθώς οδηγεί στη χημειοταξία των μονοκυττάρων της κυκλοφορίας στον έσω χιτώνα, κυρίως, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα μόρια VCAM-1 και ICAM-1, όπου και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα [24]. Τα μακροφάγα μετατρέπονται επακόλουθα σε αφρώδη κύτταρα τα οποία επάγουν τη χημειοταξία επιπλέον φλεγμονωδών κυττάρων στο ενδοθήλιο του αρτηριακού τοιχώματος [14]. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να οδηγήσουν στη μετατροπή ενός φυσιολογικού αγγείου σε αγγείο με αθηρωματική πλάκα και επακόλουθη θρόμβωση [24] [30]. Συνεπώς, οι παρατηρούμενες αλλαγές των εν λόγω λειτουργιών των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από την rHDL-apoE3 θα μπορούσαν να συμβάλουν στη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας του αρτηριακού τοιχώματος, να επάγουν την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου και να καθυστερήσουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

Σε πρώτο στάδιο, η παρούσα μελέτη προχώρησε στο χαρακτηρισμό σε μεταγραφικό επίπεδο των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη μετανάστευση, στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην απόπτωση και στην επιβίωση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία επηρεάζονται από την rHDL-apoE3. Η επιλογή των συγκεκριμένων λειτουργιών βασίστηκε στο γεγονός ότι οι λειτουργίες αυτές ήταν οι πιο στατιστικά σημαντικά αλλαγμένες σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης και στον κεντρικό τους ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου και στην επανενδοθηλιοποίηση μετά από αγγειακό τραυματισμό [214] [220]. Η rHDL-apoE3 προκάλεσε ποικίλες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης στα σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT και καθοδικά των ιντεγκρινών, με τις περισσότερες αλλαγές να παρατηρούνται στο πρώτο μονοπάτι ενώ

ένας αξιοσημείωτος αριθμός αλλαγών εντοπίστηκε στο δεύτερο μονοπάτι. Με βάση το βιολογικό ρόλο των γονιδίων του εκάστοτε μονοπατιού και το σύνολο των παρατηρούμενων μεταγραφικών αλλαγών σε αυτό, αναμένεται η ενεργοποίηση των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2 και PI3K/AKT από την rHDL-apoE3, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η επώαση των HRMEC κυττάρων με την ανθρώπινη apoE3 οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού τους μέσω ενός μηχανισμού που περιλάμβανε την ενεργοποίηση της eNOS [377], ένα μόριο που μπορεί να ενεργοποιηθεί καθοδικά του μονοπατιού PI3K/AKT [487]. Επιπλέον, σημαντικές αλλαγές γονιδιακής έκφρασης παρατηρήθηκαν στα σηματοδοτικά μονοπάτια διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων PI3K/AKT/eNOS, MEK1/2/ERK1/2 και καθοδικά των ιντεγκρινών, και ειδικότερα η rHDL-apoE3 προκάλεσε τις περισσότερες αλλαγές στο πρώτο μονοπάτι. Η rHDL-apoE3 οδήγησε, επίσης, σε σημαντικές αλλαγές γονιδιακής έκφρασης στα σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων του κύτοχρώματος C, των p38 MAPK ή/και JNK κινασών, των υποδοχέων θανάτου και του P53. Οι περισσότερες μεταγραφικές αλλαγές παρατηρήθηκαν στο μονοπάτι του κυτοχρώματος C, οι οποίες στο σύνολό τους προτείνουν την ενδεχόμενη απενεργοποίηση του μονοπατιού από την rHDL-apoE3. Τέλος, η rHDL-apoE3 προκάλεσε αλλαγές έκφρασης σε έναν αξιοσημείωτο αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία συμμετέχουν κυρίως στο μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT. Με βάση το σύνολο των μεταγραφικών αυτών αλλαγών, το μονοπάτι PI3K/AKT αναμένεται να ενεργοποιείται από την rHDL-apoE3. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να προστατεύει τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από απόπτωση και να επάγει επιβίωση σε αυτά. Η ενδεχόμενη αντιαποπτωτική δράση της rHDL-apoE3 υποστηρίζεται από μία προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι η HDL η οποία απομονώθηκε από πλάσμα διαγονιδιακών apoE^{-/-} ποντικών ομόζυγων για την ανθρώπινη apoE3 μείωσε την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση των HUVEC κυττάρων μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των κασπασών 3 και 7 [378]. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο και η βιολογική τους σημασία συζητούνται εντενώς παρακάτω.

Η πιο στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένη λειτουργία των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 η οποία εμφάνισε τις περισσότερες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης ήταν η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η λειτουργία αυτή παίζει κρίσιμο ρόλο στα πρώιμα στάδια της επανενδοθηλιοποίησης του έσω χιτώνα μετά από αγγειακό

τραυματισμό, και συμβάλλει στην αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου και στη διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας [214] [220]. Μέσω των μηχανισμών αυτών, η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην περιοχή του τραυματισμένου ενδοθηλίου ενός αθηρωματικού αγγείου συμβάλλει στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ή ακόμη και στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης [206, 207] [212] [215]. Για τους λόγους αυτούς, η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στο χαρακτηρισμό των σηματοδοτικών μονοπατιών μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό, πρωτεϊνικό και λειτουργικό επίπεδο και σε βαθμό ενεργοποίησης. Η rHDL-apoE3 προκάλεσε πολυάριθμες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης στα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9, καθοδικά των RHO-GTPασών και καθοδικά των ιντεγκρινών. Οι περισσότερες αλλαγές παρατηρήθηκαν στα τρία πρώτα μονοπάτια, οι οποίες υποδηλώνουν την υπερέκφραση των μονοπατιών αυτών από την rHDL-apoE3 σε μεταγραφικό επίπεδο. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στον περαιτέρω χαρακτηρισμό των τριών αυτών μονοπατιών. Με βάση το βιολογικό ρόλο των γονιδίων του εκάστοτε μονοπατιού και το σύνολο των παρατηρούμενων αλλαγών γονιδιακής έκφρασης σε αυτό, τα μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών αναμένεται να ενεργοποιούνται από την rHDL-apoE3. Όντως, τα ευρήματα και οι προβλέψεις αυτές επιβεβαιώθηκαν σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης και ενεργοποίησης. Ειδικότερα, η επαγόμενη από την rHDL-apoE3 υπερέκφραση τεσσάρων μορίων-κλειδιών των μονοπατιών μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών - PIK3CG, EFNB2, ID1 και FLT1 - σε μεταγραφικό επίπεδο στα HAEC κύτταρα επιβεβαιώθηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε δύο τύπους ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, τα HCAEC και EA.hy926 κύτταρα. Σε επίπεδο ενεργοποίησης, η rHDL-apoE3 αύξησε τη φωσφορυλίωση των βασικών μορίων τελεστών ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK των μονοπατιών μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών στα κύτταρα αυτά, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η rHDL-apoE3 αυξάνει τη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των PIK3CG, EFNB2, ID1 και FLT1 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, μόρια με σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Το PIK3CG κωδικοποιεί για την καταλυτική υπομονάδα p110γ της κινάσης PI3Kγ, η οποία επάγει επιλεκτικά τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθοδικά των υποδοχέων GPCRs [509, 510]. Η EFNB2 κωδικοποιεί για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών

κυττάρων είτε μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς EPHB2/B4 ή ανεξάρτητα από αυτούς [500-502]. Ο ID1 κωδικοποιεί για ένα μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων bHLH (basic helix-loop-helix) που έχει ρυθμιστικό ρόλο στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [498] [511]. Ο FLT1 κωδικοποιεί για ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης του VEGF που μέσω φωσφορυλίωσης οδηγεί στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [479] [512]. Η υπερέκφραση των PIK3CG, EFNB2, ID1 και FLT1 έχει δειχθεί ότι επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης ποικίλων καθοδικών μοριακών μηχανισμών. Ειδικότερα, μελέτες έχουν δείξει ότι κάθε ένα από τα PIK3CG, EFNB2, ID1 και FLT1 ενεργοποιεί την κινάση AKT καθοδικά της PI3K [499] [501] [509] [512]. Τα PIK3CG και EFNB2 έχει δειχθεί ότι ενεργοποιούν τις κινάσες ERK1/2 καθοδικά των MEK1/2, καθώς και την eNOS και την RAC1-GTPάση [500] [502] [509, 510] [513, 514]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα EFNB2 και ID1 επάγουν την ενεργοποίηση των μεταλοπρωτεϊνών MMP-2/9 [499] [501] [515], και ότι ο FLT1 ενεργοποιεί την RAC1-GTPάση και την p38 MAPK κινάση [479] [512]. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι η παρατηρούμενη υπερέκφραση των PIK3CG, EFNB2, ID1 και FLT1 από την rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα θα μπορούσε να οδηγήσει στην ενεργοποίηση σημαντικών μορίων τελεστών της κυτταρικής μετανάστευσης και σε επακόλουθη μετανάστευση των κυττάρων αυτών.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η rHDL-apoE3 αύξησε την ενεργοποίηση των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν στα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών. Η ενεργοποίηση κάθε ενός από τα μόρια αυτά έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της F-ακτίνης και σε επακόλουθη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω φωσφορυλίωσης καθοδικών σηματοδοτικών μορίων. Ειδικότερα, οι κινάσες ERK1/2 ενεργοποιούνται από τις MEK1/2 κινάσες μέσω φωσφορυλίωσης στα αμονοξικά κατάλοιπα Tyr204/187 και Thr202/185 [489]. Οι ενεργοποιημένες ERK1/2 φωσφορυλιώνουν καθοδικά τις κινάσες MLCK και FAK ή την πρωτεάση καλπαΐνη, οι οποίες ρυθμίζουν τη συστολή μυοσίνης, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, το σχηματισμό λαμελιποδίων και τη συγκρότηση/αποσυγκρότηση των εστιών προσκόλλησης (focal adhesion), οδηγώντας τελικά σε επαγωγή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων [516]. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των ERK1/2 εμπλέκεται στην τοπική αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του ενδοθήλιου, μία σημαντική διαδικασία που απαιτείται για τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [487]. Η AKT ενεργοποιείται από την PI3K κινάση μέσω

φωσφορυλίωσης στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser473 και Thr308 [490]. Η φωσφορυλιωμένη AKT ενεργοποιεί καθοδικά την eNOS μέσω φωσφορυλίωσης στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser1179 (eNOS^{Ser1179}) και οδηγεί στην παραγωγή του NO [491] [517]. Το NO επάγει επακόλουθα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως η φωσφορυλίωση των κινασών FAK και Src, οδηγώντας στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [487] [518, 519]. Η p38 MAPK ενεργοποιείται από την RAC1-GTPάση μέσω φωσφορυλίωσης στα αμινοξικά κατάλοιπα Thr180 and Tyr182 [493]. Η φωσφορυλιωμένη p38 MAPK επάγει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τον επακόλουθο σχηματισμό λαμελιποδίων μέσω ενεργοποίησης της MAPKAPK2/3 κινάσης, οδηγώντας στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [520]. Επομένως, με βάση τα ευρήματα αυτά, η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της παρατηρούμενης ενεργοποίησης των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών, η οποία χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών PIK3CG, EFNB2, FLT1 και ID1 και τη φωσφορυλίωση των ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK.

Σε συμφωνία με τις μοριακές αλλαγές σε επίπεδο γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης και σε βαθμό ενεργοποίησης που παρατηρήθηκαν στα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, η rHDL-apoE3, σε κυτταρικό επίπεδο, αύξησε σημαντικά τη μετανάστευση των HCAEC και EA.hy926 κυττάρων. Η δράση αυτή της rHDL-apoE3 έχει μεγάλη βιολογική σημασία, καθώς η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι μία κρίσιμη διαδικασία στην αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου του έσω χιτώνα, η οποία εμπλέκεται στα πρώιμα στάδια της επανενδοθηλιοποίησης ενός αγγείου με αθηρωματικές αλλοιώσεις [214] [220]. Ειδικότερα, η μετανάστευση των τοπικών γειτονικών αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων ή των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs, endothelial progenitor cells) που προέρχονται από το μυελό των οστών στις περιοχές αγγειακού τραυματισμού προάγει την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου (αναγέννηση ενδοθηλίου) μέσω της άμεσης ενσωμάτωσης των κυττάρων αυτών στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία, της διαφοροποίησής τους σε ώριμα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, της επαγωγής της επαναγγείωσης του ενδοθηλίου και της βελτίωσης της ενδοθηλιακής λειτουργίας [205] [207]. Μέσω των μηχανισμών αυτών, η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στις περιοχές του τραυματισμένου ενδοθηλίου ενός αθηρωματικού αγγείου συμβάλλει στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ή ακόμη και στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης [206] [214] [220]. Όντως, η μετανάστευση

των κυκλοφορούντων EPCs στο τραυματισμένο ενδοθήλιο του αρτηριακού τοιχώματος έχει αντιστρόφως συσχετισθεί με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και τον κίνδυνο εμφάνισης μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων [206] [212]. Αντιθέτως, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ή η βλάβη στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και στην εμφάνιση των κλινικών επιπλοκών της νόσου, ενώ αποτελεί προγνωστικό δείκτη κινδύνου εμφάνισης νέων καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς με προϋπάρχουσα CVD [24] [30-32]. Συνεπώς, η επαγωγή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως επιτυγχάνεται από την rHDL-apoE3, είναι ένα ιδιαίτερα επιθυμητό χαρακτηριστικό για μία νέα θεραπεία έναντι της ASCAD, υποστηρίζοντας τη θεραπευτική προοπτική της rHDL-apoE3.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ανέδειξαν τα μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών ως τους πιθανούς εμπλεκόμενους μηχανισμούς μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να εμπλέκονται και εναλλακτικά μοριακά μονοπάτια [487, 488]. Η rHDL-apoE3 ενεργοποίησε τα ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK που αποτελούν βασικά μόρια τελεστές της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχουν στα μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών [488]. Τα μόρια αυτά, όμως, έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται σε πολλές επιπλέον λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η επιβίωση [487]. Συνεπώς, ο επόμενος στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν τα ERK1/2, AKT, eNOS και p38 MAPK αποτελούν τα καθοδικά μόρια τελεστές των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ειδική χημική καταστολή της ενεργοποίησης των κινασών MEK1/2, οι οποίες αποτελούν τον κύριο άμεσο ενεργοποιητή των ERK1/2 κινασών [489], εμπόδισε την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 φωσφορυλίωση των ERK1/2 στα HCAEC κύτταρα. Επιπλέον, σε λειτουργικό επίπεδο, η χημική αναστολή των MEK1/2 εμπόδισε την επαγωγή της μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων από την rHDL-apoE3. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τη ειδική χημική καταστολή της ενεργοποίησης της PI3K κινάσης, η οποία αποτελεί το βασικό άμεσο ενεργοποιητή της AKT [490], ενώ μπορεί να ενεργοποιήσει έμμεσα την p38 MAPK και την eNOS, μέσω της RAC1-GTPάσης και της AKT, αντίστοιχα [198] [209] [491] [493, 494]. Ειδικότερα, η χημική αναστολή της PI3K εμπόδισε τη φωσφορυλίωση των AKT και p38 MAPK από την rHDL-

apoE3 στα HCAEC κύτταρα. Επιπλέον, η χημική αναστολή της PI3K, σε λειτουργικό επίπεδο, οδήγησε σε σημαντική μείωση της επαγόμενης από την rHDL-apoE3 μετανάστευσης των HCAEC κυττάρων. Τα συνολικά αυτά ευρήματα υποδηλώνουν ότι η φωσφορυλίωση των MEK1/2 και PI3K απαιτείται για την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 ενεργοποίηση των ERK1/2, AKT και p38 MAPK, αντίστοιχα, στα HCAEC κύτταρα, και ότι οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί είναι απαραίτητοι για την επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων αυτών από την rHDL-apoE3. Συνεπώς, η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τις κινάσες ERK1/2, AKT και p38 MAPK καθοδικά των κινασών MEK1/2 και PI3K, αντίστοιχα, και μέσω των μηχανισμών αυτών επάγει τη μετανάστευση των HCAEC κυττάρων (Εικόνα 5.1). Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι τα μονοπάτια MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών εμπλέκονται άμεσα στην επαγωγή της μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από την rHDL-apoE3 (Εικόνα 5.1).

Αντίθετα, η χημική αναστολή της PI3K δεν επηρέασε τη φωσφορυλίωση της eNOS από την rHDL-apoE3 στα HCAEC κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί την eNOS στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που είναι ανεξάρτητος της PI3K. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η eNOS μπορεί να ενεργοποιηθεί (eNOS^{Ser1179} φωσφορυλίωση) από αρκετές άλλες κινάσες στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως οι εξαρτώμενες από το cAMP πρωτεϊνικές κινάσες A (cAMP-dependent protein kinase A (PKA)) και G (cAMP-dependent protein kinase G (PKG)) και η ενεργοποιούμενη από το AMP πρωτεϊνική κινάση (AMPK, AMP-activated protein kinase) [521-524]. Όντως, μία μελέτη έδειξε ότι η HDL που απομονώθηκε από πλάσμα ανθρώπου (hHDL) ενεργοποίησε την eNOS στα HUVEC και HAEC κύτταρα μέσω ενεργοποίησης της AMPK [152].

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η χημική αναστολή της PI3K μείωσε σε σημαντικό βαθμό την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 μετανάστευση των HCAEC κυττάρων αλλά δεν επηρέασε τη φωσφορυλίωση της eNOS από την rHDL-apoE3 στα κύτταρα αυτά, είναι ενδιαφέρον να υποθέσουμε ότι η ενεργοποίηση της eNOS μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την επαγωγή της μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από την rHDL-apoE3. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από μία προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα ανθρώπινης apoA-I, φωσφατιδυλοχολίνης και χοληστερόλης) αύξησε τη μετανάστευση των BAEC κυττάρων μέσω μηχανισμών οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι της ενεργοποίησης της eNOS [209]. Ωστόσο, η παρατηρούμενη αύξηση στην ενεργοποίηση της

eNOS από την rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να συμβάλει σε άλλες αθηροπροστατευτικές της λειτουργίες, καθώς έχει δειχθεί ότι το NO που παράγεται από την eNOS προστατεύει την ακεραιότητα του ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος, μειώνει την προσκόλληση των μονοκυττάρων και T λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro και in vivo και την επακόλουθη φλεγμονή και εμποδίζει την ενεργοποίηση, προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων [22] [24, 25] [525]. Όντως, μία σειρά από μελέτες έχει δείξει ότι οι hHDL και rHDL-apoA-I (σύμπλοκα ανθρώπινης apoA-I και φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) εκδηλώνουν τις αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές τους ιδιότητες στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης της eNOS και επακόλουθης παραγωγής του NO [50] [103] [262] [390]. Ομοίως, έχει δειχθεί ότι η apoE εμποδίζει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και μειώνει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα κύτταρα αυτά μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν την παραγωγή του NO καθοδικά της ενεργοποίησης της eNOS [352, 353].

Επόμενος στόχος της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός κεντρικών γονιδίων-ρυθμιστών μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγει επακόλουθα τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Εστιαστήκαμε στη μελέτη του γονιδίου ID1 επειδή: 1) το γονίδιο αυτό παίζει κεντρικό ρόλο και στα τρία αυτά μονοπάτια μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που ενεργοποιούνται από την rHDL-apoE3, 2) ο ID1 υπερέκφράζεται σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από επώαση με την rHDL-apoE3 και 3) έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση του ID1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνει την ενεργοποίηση της AKT μέσω της PI3K, και επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών [497, 498] [499] [511] [515] [526, 527]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 εμπόδισε την επαγόμενη από την rHDL-apoE3 φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 στα EA.hy926 κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι ο ID1 απαιτείται για την ενεργοποίηση των κινασών αυτών από την rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 στα EPCs ανθρώπου ή ποντικού μειώνει τη φωσφορυλίωση της AKT, ενώ η υπερέκφραση του γονιδίου αυτού σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προστάτη αυξάνει την ενεργοποίηση των ERK1/2 [499] [505] [526] [528]. Σε λειτουργικό επίπεδο, η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 μείωσε σημαντικά την επαγωγή της μετανάστευσης των EA.hy926 κυττάρων από την rHDL-apoE3, χωρίς να την εμποδίζει πλήρως. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο ID1 είναι ένας κύριος, αλλά όχι ο αποκλειστικός ρυθμιστής της επαγόμενης από την rHDL-apoE3

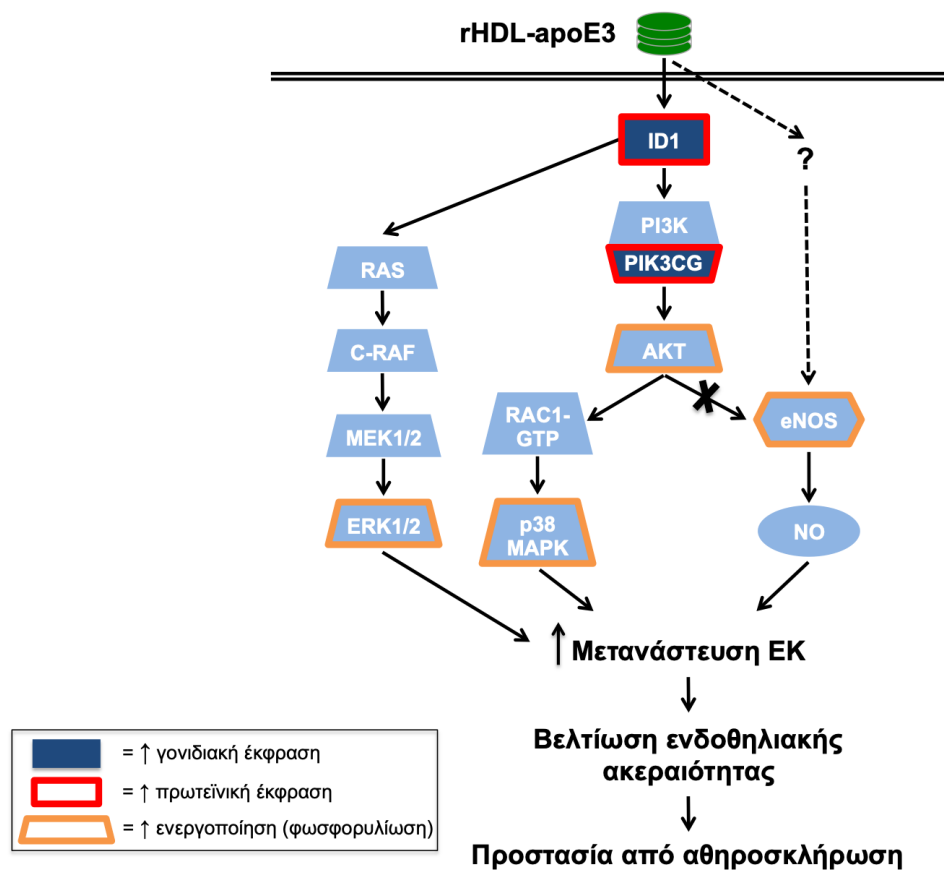
μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 στα EPCs ανθρώπου ή ποντικού και στα HUVEC κύτταρα μειώνει σημαντικά τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών [497, 498] [511] [515] [527]. Συνοψίζοντας, η γονιδιακή αποσιώπηση του ID1 μείωσε σημαντικά την επαγωγή της μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από την rHDL-apoE3 εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2 και AKT στα κύτταρα αυτά. Τα συνολικά ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω υπερέκφρασης του ID1, και ότι μέσω αυτών των μηχανισμών η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών (Εικόνα 5.1).

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε τον ID1 ως έναν κύριο ρυθμιστή της επαγόμενης από την rHDL-apoE3 ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών μετανάστευσης στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και της επακόλουθης μετανάστευσης των κυττάρων αυτών. Αυτός ο μηχανισμός δράσης της rHDL-apoE3 μέσω του ID1 έχει μεγάλη βιολογική σημασία επειδή ο ID1 έχειδειχθεί ότι παίζει άμεσο ρόλο στη ρύθμιση της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* [497-499] [526] [529]. Οι λειτουργίες αυτές παίζουν κρίσιμο ρόλο στην επανενδοθηλιοποίηση μετά από αγγειακό τραυματισμό και στην αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου *in vivo* [214] [220]. Με βάση αυτά τα ευρήματα, είχε προταθεί ότι ο ID1 μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου, την επανενδοθηλιοποίηση και την πρόληψη της επαναστένωσης μετά από αγγειακό τραυματισμό [497, 498] [526] [529]. Όντως, *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του ID1 επάγει την ταχεία επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του αγγειακού ενδοθηλίου και εμποδίζει την πρώιμη υπερπλασία του έσω χιτώνα σε ένα μοντέλο αρουραίου με τραυματισμό της καρωτιδικής αρτηρίας [529]. Επιπροσθέτως, ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου *Id1* (*Id1* ^{-/-}) εμφάνισαν αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και απόπτωση του ενδοθηλίου στους πνεύμονες μετά από τραυματισμό, υποδηλώνοντας ότι ο *Id1* επάγει την αποκατάσταση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας και την επιβίωση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό [530]. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με το ότι η παρούσα μελέτη ανέδειξε τον ID1 ως έναν κύριο ρυθμιστή της επαγόμενης από την rHDL-apoE3 μετανάστευσης των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προτείνουν ότι η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να επάγει

την επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό, εν μέρει μέσω του ID1.

Προκειμένου να διερευνηθεί η υπόθεση αυτή και να μελετηθεί η αθηροπροστατευτική δράση της rHDL-apoE3 *in vivo*, χρησιμοποιήθηκε ένα εδραιωμένο ζωικό μοντέλο ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, υπερχοληστερολαιμίας και αθηροσκλήρωσης, και συγκεκριμένα C57BL/6J ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της apoE (apoE KO, apoE knockout) [314, 315] [531]. Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοχημείας του Καθηγητή κ. Καρδάση Δημήτρη στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης, και τα *in vivo* πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτωρ κα. Δαλακούρα-Καραγκούνη Κατερίνα. Ο απώτερος σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να αξιολογηθεί η δράση της rHDL-apoE3 σε παθολογικές συνθήκες που εμπλέκονται στην ASCAD, όπως η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η υπερχοληστερολαιμία, η οποία είναι παράγοντας κινδύνου για την ASCAD, και η αθηροσκλήρωση. Η ενδοβλέβια χορήγηση μίας εφάπαξ δόσης της rHDL-apoE3 (40mg/kg για 24h) στα apoE KO ποντίκια (ηλικίας 24 εβδομάδων σε δίαιτα κανονικής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη) μείωσε σημαντικά τη διαπερατότητα του αγγειακού ενδοθηλίου, όπως αποδείχθηκε από τη μειωμένη συγκέντρωση της χρωστικής Evans Blue σε συγκεκριμένους ιστούς (όπως, το στομάχι, η γλώσσα και η ουροδόχος κύστη), σε σχέση με τα ποντίκια αναφοράς στα οποία χορηγήθηκε PBS [532]. Η χρωστική αυτή προσδένεται στην αλβουμίνη και, υπό φυσιολογικές συνθήκες, το αγγειακό ενδοθήλιο είναι αδιαπέραστο στην αλβουμίνη, αλλά σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στα apoE KO ποντίκια με υπερχοληστερολαιμία, το ενδοθήλιο γίνεται διαπερατό από την αλβουμίνη επιτρέποντας τη μεταφορά της χρωστικής σε παρακείμενους ιστούς [533, 534]. Η παρατηρούμενη βελτίωση της ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου που προκλήθηκε από την rHDL-apoE3 στα ποντίκια θα μπορούσε να αποδοθεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς η λειτουργία αυτή είναι κρίσιμη για την αποκατάσταση και την αναγέννηση του αγγειακού ενδοθηλίου μετά από τραυματισμό [535]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από τα *in vitro* ευρήματα της παρούσας μελέτης σύμφωνα με τα οποία η rHDL-apoE3 ενεργοποίησε τα μονοπάτια μετανάστευσης MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και οδήγησε σε επακόλουθη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Οι μηχανισμοί αυτοί δράσης της rHDL-apoE3 θα μπορούσαν ενδεχομένως να συμβάλουν στην παρατηρούμενη μείωση της διαπερατότητας του αγγειακού ενδοθηλίου στα apoE KO ποντίκια. Η αξιολόγηση του ρόλου του ID1 στην *in vivo* αυτή αθηροπροστατευτική δράση

της rHDL-αποΕ3 θα ήταν ενδιαφέρουσα στα πλαίσια μίας μελλοντικής μελέτης. Όμως, στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο ID1 έχει δειχθεί ότι συμβάλει στην καρκινογένεση διευκολύνοντας την αγγειογένεση του όγκου, κυρίως μέσω ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Η υπερέκφραση του ID1 έχει συσχετισθεί με το στάδιο του καρκίνου, την κακή πρόγνωση σε ορισμένους τύπους καρκίνου και τη μετάσταση [536]. Συνεπώς, η επίδραση του ID1 στην καρκινογένεση πρέπει να ληφθεί υπόψη σε μελλοντικές προκλινικές και κλινικές μελέτες αξιολόγησης της rHDL-αποΕ3.



Εικόνα 5.1: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την rHDL-αποΕ3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (ΕΚ) μέσω των οποίων επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Μέσω αυτών των μηχανισμών, η rHDL-αποΕ3 αναμένεται να επάγει την επανενδοθηλιοποίηση, την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου και τη διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου, να μειώνει την αγγειακή ενδοθηλιακή διαπερατότητα και επακόλουθα να προστατεύει από την αθηροσκλήρωση. ↑ = αύξηση στη(ν).

Η αθηροπροστατευτική δράση της rHDL-αποΕ3 in vivo υποστηρίζεται, επίσης, από τα

ευρήματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση της επίδρασής της στην υπερχοληστερολαιμία στα apoE KO ποντίκια [532]. Ειδικότερα, η ενδοβλέβια χορήγηση μίας εφάπαξ δόσης της rHDL-apoE3 (80mg/kg για 24h) στα ποντίκια οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων της LDL-C του ορού και σε αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης (αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων) στο ήπαρ σε σχέση με τα ποντίκια αναφοράς. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι η rHDL-apoE3 οδήγησε σε ταχεία ηπατική κάθαρση των LDL σωματιδίων του ορού στα ποντίκια. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία σημαντική ταχεία μείωση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης του ορού στα ποντίκια ακόμη και 2h μετά τη χορήγηση της rHDL-apoE3, τα οποία παρέμειναν χαμηλά μέχρι και τις 24h. Τέλος, η χορήγηση της rHDL-apoE3 στα ποντίκια οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της HDL-C του ορού σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία (περίπου 8-24h), ενώ παρατηρήθηκε μία ταχεία παροδική αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του ορού τα οποία σχεδόν επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία (περίπου 8-24h). Τα συνολικά αυτά ευρήματα υποδεικνύουν ότι η rHDL-apoE3 βελτιώνει την υπερχοληστερολαιμία στα apoE KO ποντίκια, και αναδεικνύουν την αθηροπροστατευτική της δράση *in vivo*, υποστηρίζοντας περαιτέρω τη θεραπευτική της προοπτική έναντι της ASCAD.

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στο χαρακτηρισμό των σηματοδοτικών μονοπατιών μετανάστευσης που ενεργοποιούνται από την rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των οποίων επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Ωστόσο, δεν προσδιορίστηκαν οι υποδοχείς και δε διερευνήθηκαν εις βάθος οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα εν λόγω μονοπάτια στα κύτταρα αυτά. Η διερεύνηση των μηχανισμών αυτών, και ειδικότερα του μηχανισμού δράσης της rHDL-apoE3 μέσω του ID1, θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μία ενδιαφέρουσα ανεξάρτητη μελλοντική μελέτη. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα ανθρώπινης apoA-I πλάσματος και φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς χοληστερόλη) αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα SR-BI και οδηγεί σε αύξηση της μετανάστευσης των HUVEC και BAEC κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών CaMKK-LKB1/AMPK/PI3K/AKT, Src/PI3K/AKT/RAC-GTPάση και Src/PI3K/MEK/ERK/RAC-GTPάση, αντίστοιχα. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός δράσης της rHDL-apoA-I περιλάμβανε την πρόσδεση της apoA-I στον SR-BI [151] [209]. Η αλληλεπίδραση της rHDL-apoA-I με τον SR-BI και η επακόλουθη μοριακή σηματοδότηση οδήγησε σε επαγωγή της επανενδοθηλιοποίησης του έσω χιτώνα σε apoA-I +/- ποντίκια στα οποία προκλήθηκε τραυματισμός της καρωτιδικής αρτηρίας [209]. Η rHDL-apoE3 (σύμπλοκα ανθρώπινης apoE3, φωσφατιδυλοχολίνης και χοληστερόλης) έχει δειχθεί ότι, επίσης, αλληλεπιδρά με τον SR-BI *in vitro* [114]. Επιπλέον,

μία μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ότι η ανθρώπινη apoE3 ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/AKT/eNOs στα BAEC κύτταρα μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα ApoER2 και οδηγεί σε αύξηση της μετανάστευσης των κυττάρων αυτών [353]. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η έκφραση της ανθρώπινης apoE3 μέσω αδενομεταφοράς σε άγριου τύπου ποντίκια στα οποία προκλήθηκε τραυματισμός της καρωτιδικής αρτηρίας οδήγησε σε επαγωγή της επανενδοθηλιοποίησης και σε αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου. Ο μηχανισμός δράσης της apoE3 περιλάμβανε την πρόσδεση στον ApoER2 [353]. Σε συμφωνία με τα προαναφερόμενα ευρήματα, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης παρόμοιων σηματοδοτικών μονοπατιών και βελτιώνει την ακεραιότητα του αγγειακού ενδοθηλίου στα apoE KO ποντίκια. Τα *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε συνδυασμό με τα ευρήματα των προαναφερόμενων μελετών υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω του SR-BI ή/και του ApoER2, και επακόλουθα να επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Προκειμένου να μελετηθεί εάν οι SR-BI και ApoER2 εμπλέκονται στην επαγόμενη από την rHDL-apoE3 ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους υποδοχείς αυτούς, τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση της ολικής γονιδιακής έκφρασης στα HAEC κύτταρα μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων αυτών. Ωστόσο, η απουσία αλλαγών γονιδιακής έκφρασης δεν αποκλείει το ενδεχόμενο οι υποδοχείς SR-BI και ApoER2 να εμπλέκονται στους μηχανισμούς με τους οποίους η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (π.χ. μέσω αλλαγών σε επίπεδο ενεργοποίησης). Η αξιολόγηση της επίδρασης της rHDL-apoE3 στην ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών θα ήταν ενδιαφέρουσα.

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην περιοχή του αγγειακού τραυματισμού είναι το αρχικό στάδιο στην επανενδοθηλιοποίηση ενός αθηρωματικού αγγείου και συμβάλλει στην αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου. Οι διαδικασίες αυτές είναι απαραίτητες για την πρόληψη και τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης [214] [220]. Η θεραπευτική αξία της ικανότητας της rHDL-apoE3 να επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων υποστηρίζεται από προκλινικές και κλινικές μελέτες που αξιολογούν φάρμακα ή θεραπευτικές προσεγγίσεις στο στάδιο κλινικών δοκιμών έναντι της ASCAD, όπως οι στατίνες, οι αναστολείς της PCSK9, η εξετιμίδη, η rHDL-apoA-I (σύμπλοκα ανθρώπινης apoA-I πλάσματος και φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς

χοληστερόλη) και τα πεπτιδία μιμητές της apoA-I. Ειδικότερα, οι φαρμακευτικές αυτές ουσίες έχει δειχθεί ότι επάγουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών παρόμοιων με τα παρατηρούμενα μονοπάτια μετανάστευσης που ενεργοποιούνται από την rHDL-apoE3 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως τα PI3K/AKT, PI3K/AKT/eNOS, PI3K/RAC-GTPase/p38 MAPK, PI3K/AKT/RAC-GTPase, PI3K/MEK/ERK/RAC-GTPase, RHO-GTPase/ROCK και MEK1/2/ERK1/2 [198] [209] [537-539]. Μέσω επαγωγής της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στην περιοχή του τραυματισμένου ενδοθηλίου, οι ουσίες αυτές έχει δειχθεί ότι προάγουν την επανενδοθηλιοποίηση του έσω χιτώνα σε ζωικά μοντέλα τραυματισμού της καρωτιδικής αρτηρίας ή αθηροσκλήρωσης [202] [209] [540-542]. Επιπλέον, η χορήγηση ατορβαστατίνης ή αναστολέων της PCSK9 σε ασθενείς με CAD και η έγχυση της rHDL-apoA-I (σύμπλοκα ανθρώπινης apoA-I πλάσματος με φωσφατιδυλοχολίνη) σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II αύξησε τη μετανάστευση των κυκλοφορούντων EPCs, επάγοντας την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου [219] [543, 544]. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με τα *in vitro* αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προτείνουν ότι η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να προάγει την αποκατάσταση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας μετά από αγγειακό τραυματισμό επάγοντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών, και με τον τρόπο αυτό να προστατεύει από την αθηροσκλήρωση. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από τα *in vivo* ευρήματα της παρούσας μελέτης που έδειξαν ότι η rHDL-apoE3 βελτιώνει την ακεραιότητα του αγγειακού ενδοθηλίου στα apoE KO ποντίκια.

5.2. Περιορισμοί της μελέτης και μελλοντικά πειράματα

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην επίδραση της rHDL-apoE3 στη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και στο χαρακτηρισμό των σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Ο κρίσιμος ρόλος της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πρώιμα στάδια της επανενδοθηλιοποίησης ενός αθηρωματικού αγγείου [214] [220] και ο μεγάλος αριθμός των παρατηρούμενων αλλαγών γονιδιακής έκφρασης που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτέλεσαν τους λόγους για τους οποίους η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη λειτουργία αυτή. Ωστόσο, η rHDL-apoE3 προκάλεσε, επίσης, στατιστικώς σημαντικές αλλαγές γονιδιακής έκφρασης σε ένα εύρος άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι λειτουργίες αυτές είναι σημαντικές για

διατήρηση της ενδοθηλιακής ακεραιότητας και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό, και κατ' αυτόν τον τρόπο προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση [214] [220]. Συνεπώς, η περαιτέρω διερεύνηση των επιπρόσθετων αθηροπροστατευτικών μοριακών μηχανισμών που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 κρίνεται χρήσιμη, προκειμένου να αξιολογηθεί σε σφαιρικό επίπεδο η δράση της στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο προσδιορισμός των υποδοχέων και η εις βάθος διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια μετανάστευσης στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα θα συμβάλλει, επίσης, στην πιο ολοκληρωμένη αξιολόγηση της *in vitro* δράσης της. Επιπλέον, από την αξιολόγηση της rHDL-apoE3 σε ένα ζωικό μοντέλο υπερχοληστερολαιμίας, ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και αθηροσκλήρωσης, τα apoE KO ποντίκια, προέκυψαν προκαταρκτικά ευρήματα που υποστηρίζουν τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της rHDL-apoE3 *in vivo*. Ειδικότερα, η χορήγηση μίας εφάπαξ δόσης της rHDL-apoE3 στα ποντίκια αυτά βελτίωσε την υπερχοληστερολαιμία και μείωσε τη διαπερατότητα του αγγειακού ενδοθηλίου [532]. Όμως, επιπλέον εις βάθος μελέτες θα χρειαστούν για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση της αθηροπροστατευτικής δράσης της rHDL-apoE3 *in vivo*. Μεταξύ αυτών, προκλινικές μελέτες μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας που θα αξιολογούν τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της rHDL-apoE3 στην υπερχοληστερολαιμία, στην αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό και στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας θα πρέπει να πραγματοποιηθούν. Τα ευρήματα της παρούσας *in vivo* μελέτης, επίσης, χρήζουν περαιτέρω διερεύνηση σε επιπλέον ζωικά μοντέλα υπερχοληστερολαιμίας, ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και αθηροσκλήρωσης, καθώς και εκτεταμένο χαρακτηρισμό των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στις δράσεις της rHDL-apoE3 *in vivo*.

5.3. Συμπεράσματα

Η rHDL-apoE3 προκάλεσε σημαντικές αλλαγές γονιδιακής έκφρασης σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μετανάστευση, στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην απόπτωση και στην επιβίωση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*. Μέσω αυτών των αλλαγών, η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς οι λειτουργίες αυτές συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου και επάγουν την επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου ενός αθηρωματικού αγγείου. Ο περαιτέρω χαρακτηρισμός των μονοπατιών μετανάστευσης σε μοριακό και λειτουργικό επίπεδο έδειξε ότι η rHDL-

apoE3 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών MEK1/2/ERK1/2, PI3K/AKT/eNOS-MMP2/9 και των RHO-GTPασών (Εικόνα 5.1). Η επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων αυτών από την rHDL-apoE3 απαιτεί την ενεργοποίηση των κινασών MEK1/2 και PI3K, οι οποίες ενεργοποιούν καθοδικά τις κινάσες ERK1/2, AKT και p38 MAPK, αντίστοιχα. Συνεπώς, η rHDL-apoE3 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των ERK1/2, AKT και p38 MAPK καθοδικά των MEK1/2 και PI3K, αντίστοιχα. Ο κεντρικός ρυθμιστής μέσω του οποίου η rHDL-apoE3 ενεργοποιεί τα μονοπάτια μετανάστευσης και επάγει επακόλουθα τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας ID1 (Εικόνα 5.1). Η βιολογική σημασία των ευρημάτων αυτών είναι μεγάλη, καθώς ο ID1 αποτελεί έναν υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για την επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό, και θα μπορούσε κατ' επέκταση να παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από την αθηροσκλήρωση. Τα συνολικά *in vitro* ευρήματα υποστηρίζουν την αθηροπροστατευτική προοπτική της rHDL-apoE3, η οποία επιβεβαιώθηκε σε *in vivo* επίπεδο. Η rHDL-apoE3 μείωσε σημαντικά τη διαπερατότητα του αγγειακού ενδοθηλίου και βελτίωσε την υπερχοληστερολαιμία στα apoE KO ποντίκια. Η ικανότητα της rHDL-apoE3 να επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*, να βελτιώνει την ακεραιότητα του αγγειακού ενδοθηλίου και να μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος *in vivo* προτείνει τη δυναμική της προοπτική να προάγει την επανενδοθηλιοποίηση και την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου και να βελτιώνει την υπερχοληστερολαιμία σε ασθενείς με ASCAD, αντίστοιχα. Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης φέρουν στην επιφάνεια νέες γνώσεις σχετικά με τις αθηροπροστατευτικές δράσεις της rHDL-apoE3 *in vitro* και *in vivo*, οι οποίες θα μπορούσαν να βρουν κλινικές εφαρμογές στη θεραπεία της ASCAD στο εγγύς μέλλον.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων ορών.

| Ξενόγλωσσος Όρος | Ελληνικός Όρος |
|--------------------------------------|--|
| Acute coronary syndrome | Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο |
| Acute myocardial infarction | οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου |
| Alzheimer disease | Νόσος Alzheimer |
| Ammonium persulfate | Υπερθειικό αμμώνιο |
| AMP-activated protein kinase | Ενεργοποιούμενη από το AMP πρωτεϊνική κινάση |
| Apolipoprotein A-I | Απολιποπρωτεΐνη A-I |
| Apolipoprotein A-II | Απολιποπρωτεΐνη A-II |
| Apolipoprotein A-IV | Απολιποπρωτεΐνη A-IV |
| Apolipoprotein B-48 | Απολιποπρωτεΐνη B-48 |
| Apolipoprotein B-100 | Απολιποπρωτεΐνη B-100 |
| Apolipoprotein C-I | Απολιποπρωτεΐνη C-I |
| Apolipoprotein C-II | Απολιποπρωτεΐνη C-II |
| Apolipoprotein C-III | Απολιποπρωτεΐνη C-III |
| Apolipoprotein D | Απολιποπρωτεΐνη D |
| Apolipoprotein E | Απολιποπρωτεΐνη E |
| Apolipoprotein F | Απολιποπρωτεΐνη F |
| Apolipoprotein J | Απολιποπρωτεΐνη J |
| Apolipoprotein L-I | Απολιποπρωτεΐνη L-I |
| Apolipoprotein M | Απολιποπρωτεΐνη M |
| Atherosclerotic CAD | Αθηροσκληρωτική CAD |
| Atherosclerotic CVD | Αθηροσκληρωτική CVD |
| Atherosclerotic fatty streak lesions | Αθηρωματικές αλλοιώσεις με λιπαρές ραβδώσεις |
| «Belt» model | Μοντέλο «ζώνης» |
| cAMP-dependent protein kinase A/G | Εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση A/G |
| Cardiovascular disease | Καρδιαγγειακή νόσος |
| Cholesterol ester transfer protein | Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης |
| Chylomicrons | Χυλομικρά |
| Chylomicron remnants | Υπολείμματα χυλομικρών |
| Core Analysis | Κεντρική ανάλυση |
| Coronary artery disease | Στεφανιαία νόσος |
| Cyclic guanosine monophosphate | Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη |
| Cyclin dependent kinase inhibitor 1A | Αναστολέας της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 1A |
| Cyclin dependent kinase inhibitor 2A | Αναστολέας της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 2A |
| Cyclin dependent kinase inhibitor 1B | Αναστολέας της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 1B |
| Cyclin dependent kinase inhibitor 1C | Αναστολέας της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 1C |
| Cytochrome-C | Κυτόχρωμα C |
| Dextran-Sulfate | Θειική δεξτράνη |
| Dimethyl sulfoxide | Διμεθυλοσουλφοξίδιο |

| | |
|---|--|
| 2D-Polyacrylamide gradient gel electrophoresis | Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας |
| Endothelial basal medium | Βασικό θρεπτικό υλικό για ενδοθηλιακά κύτταρα |
| Endothelial lipase | Ενδοθηλιακή λιπάση |
| Endothelial nitric oxide synthase | Ενδοθηλιακή συνθετάση του NO |
| Familial hypo-alpha-lipoproteinemia | Οικογενής υποαλφα-λιποπρωτεϊναιμία |
| Familial hypercholesterolemia | Οικογενής υπερχοληστερολαιμία |
| Fetal bovine serum | Βόειος εμβρυακός ορός |
| F1-ATPase | β αλυσίδα της F1-ATPάσης |
| Flow through | Εκλουθέν/εκλουόμενο διάλυμα |
| HDL-C | HDL χοληστερόλη |
| Heparan sulfate proteoglycans | Πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης |
| Hepatic lipase | Ηπατική λιπάση |
| Hierarchical Clustering | Ιεραρχική Ομαδοποίηση |
| High density lipoprotein | Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας |
| Horseradish peroxidase | Υπεροξειδάση της ραπανίδας |
| Human aortic endothelial cells | Πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής |
| Human coronary endothelial cells | Πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα στεφανιαίας αρτηρίας |
| Interleukin 8 | Ιντερλευκίνη-8 |
| Intermediate density lipoprotein | Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη |
| Isopropylthio-beta-galactoside | Ισοπρόπυλ-β-D-θειογαλακτοσίδιο |
| Low density lipoprotein | Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη |
| LDL cholesterol | LDL χοληστερόλη |
| LDL receptor | Υποδοχέας της LDL |
| Lecithin:cholesterol acyl transferase | Λεκιθινο-χοληστερολο-ακυλοτρανσφεράση |
| Lipopolysaccharide | Λιποπολυσακχαρίτης |
| Lipoprotein deficient serum | Ορός φτωχός σε λιποπρωτεΐνες |
| Lipoprotein lipase | Λιποπρωτεϊνική λιπάση |
| Low density lipoprotein | Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας |
| Lysophosphatidylcholine | Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη |
| Lysosulfatide | Λυσοσουλφατίδη |
| Major histocompatibility complex | Μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας |
| Matrix metalloproteinases | Μεταλλοπρωτεϊνάσες |
| Mock-transfected cells | «Εικονικά-επιμολυσμένα» κύτταρα |
| NADPH oxidase 1 | NADPH οξειδάση 1 |
| Ni ²⁺ (Nickel)-nitrilotriacetic acid | Νικέλιο-νιτριλοτριοξεικό οξύ |
| Nitric oxide | Μονοξείδιο του αζώτου |
| Non-transfected cells | Μη επιμολυσμένα κύτταρα |
| Nuclear magnetic resonance | φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού |
| Oxidized low density lipoprotein | Οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη |
| Phospholipid transfer protein | Πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων |
| Phosphatidylethanolamine | Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη |
| Phosphatidylserine | Φωσφατιδυλοσερίνη |
| Phosphatidylglycerol | Φωσφατιδυλογλυκερόλη |

| | |
|---|--|
| Phosphatidylcholine | Φωσφατιδυλοχολίνη |
| Phosphatidylinositol | Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη |
| Phosphatidic acid | Φωσφατιδικό οξύ |
| Phosphatidylglycerol | Φωσφατιδυλογλυκερόλη |
| Phosphatidylinositol | Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη |
| Phosphatidylserine | Φωσφατιδυλοσερίνη |
| Phytohemagglutinin | Φυτο-αιμοσυγκολλητίνη |
| Plasminogen activator inhibitor type 1 | Ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου τύπου 1 |
| Platelet activating factor-acetylhydrolase | Ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων |
| Plasminogen activator inhibitor type 1 | Ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου τύπου 1 |
| Platelet activating factor | Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων |
| Phenylmethanesulfonyl fluoride | Φαινυλμεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο |
| Polyacrylamide gradient gel electrophoresis | Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας |
| Polymerase chain reaction | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης |
| Prostaglandin I2 (prostacyclin) | Προσταγλανδίνη I2 (προστακυκλίνη) |
| Reconstituted HDL | Ανασυγκροτημένη HDL |
| Reactive oxygen species | Δραστικές μορφές αναγωγής του οξυγόνου |
| Reverse cholesterol transport | Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης |
| Serum amyloid A | Αμυλοειδές A του ορού |
| Shear stress | Αιμοδυναμικές δυνάμεις |
| Small RNAs | Μικρά μόρια RNAs |
| Sodium dodecyl sulfate | Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο |
| Sphingomyelin | Σφυγγομυελίνη |
| Sphingosine-1-phosphate | 1-Φωσφορική σφιγγοσίνη |
| Sphingosylphosphorylcholine | Σφιγγοσυλοφωσφορυλοχολίνη |
| Tetramethylethylenediamine | Τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη |
| Thioredoxin | Θειορεδοξίνη |
| Thromboxane A2 | Θρομβοξάνη A2 |
| Tissue factor | Ιστικός παράγοντας |
| Tissue plasminogen activator | Ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου |
| Vascular smooth muscle cells | Αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα |
| Very low density lipoproteins | Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες |
| VLDL remnants | Υπολειμμάτα VLDL |
| Wild type | Άγριου τύπου |
| World health organization | Παγκόσμιος οργανισμός υγείας |
| Wound healing assay | Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης προσομοίωσης της «επούλωσης πληγής» |

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 1: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.

| Σύντμηση | Πλήρης Ονομασία |
|-----------------|--|
| ABCA1 | ATP binding cassette transporter A1 |
| ABCG1/G5/G8 | ATP binding cassette transporter member 1/5/8 Of Subfamily G |
| ACS | Acute coronary syndrome |
| AD | Alzheimer disease |
| AIF | Apoptosis-inducing factor |
| AKT | AKT serine/threonine Kinase |
| AMI | Acute myocardial infarction |
| AMPK | AMP-activated protein kinase |
| APC | Activated protein C |
| APS | Ammonium persulfate |
| apoA-I | Apolipoprotein A-I |
| apoA-II | Apolipoprotein A-II |
| apoA-IV | Apolipoprotein A-IV |
| apoB-100 | Apolipoprotein B-100 |
| apoB-48 | Apolipoprotein B-48 |
| apoC-I | Apolipoprotein C-I |
| apoC-II | Apolipoprotein C-II |
| apoC-III | Apolipoprotein C-III |
| apoD | Apolipoprotein D |
| apoE | Apolipoprotein E |
| ApoER2 | Apolipoprotein E receptor 2 |
| apoF | Apolipoprotein F |
| apoJ | Apolipoprotein J |
| apoL-I | Apolipoprotein L-I |
| apoM | Apolipoprotein M |
| ASCAD | Atherosclerotic CAD |
| ASCVD | Atherosclerotic CVD |
| BAD | BCL2 associated agonist of cell death |
| BAEC | Bovine aortic endothelial cells |
| Bcl-xL | B-cell lymphoma-extra large |
| BET | Bromodomain and extra-terminal domain |
| CAD | Coronary artery disease |
| CaMKK | Calcium-calmodulin dependent protein kinase kinase |
| CC | Cellular Component |
| CCL2 | C-C motif chemokine ligand 2 |
| CCL5 | C-C motif chemokine ligand 5 |
| CCND1 | Cyclin D1 |
| CCNE1 | Cyclin E1 |
| CCR2 | C-C motif chemokine receptor 2 |
| CDKN1A | Cyclin dependent kinase inhibitor 1A |
| CDKN2A | Cyclin dependent kinase inhibitor 2A |
| CDKN1B | Cyclin dependent kinase inhibitor 1B |
| CDKN1C | Cyclin dependent kinase inhibitor 1C |

| | |
|----------------|---|
| CEBPB | CCAAT enhancer binding protein beta |
| CEPT | Cholesterol ester transfer protein |
| cGMP | Cyclic guanosine monophosphate |
| CM | Chylomicrons |
| Cox-2 | Cyclooxygenase-2 |
| CREB | cAMP response element-binding protein |
| CREBBP | CREB binding protein |
| CXC(3)CL1 | C-X3-C motif chemokine ligand 1 |
| CX(3)CR1 | C-X3-C motif chemokine receptor 1 |
| CVD | Cardiovascular disease |
| cytoC | Cytochrome-C |
| DHCR24 | 3beta-hydroxysteroid-Delta 24 reductase) |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DOCK4 | Dedicator of cytokinesis 4 |
| DPPC | 1-palmitoyl-2- palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| DPPG | Diphosphatidylglycerol |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBM | Endothelial basal medium |
| E.Coli | Escherichia Coli |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid |
| EFNB2 | Ephrin B2 |
| EL | Endothelial lipase |
| eNOS | Endothelial nitric oxide synthase |
| EPC | Endothelial progenitor endothelial cells |
| ERK1/2 | Extracellular signal-regulated kinase 1/2 |
| F1-ATPase | ATP synthase F1 subunit alpha |
| FBS | Fetal bovine serum |
| FC | Fold Change |
| FDR | False Discovery Rate |
| FH | Familial hypercholesterolemia |
| FHA | Familial hypo-alpha-lipoproteinemia |
| FLT1 | Fms-related tyrosine kinase 1 (Vascular endothelial growth Factor receptor 1) |
| FOXO1 | Forkhead box protein O1 |
| FXR | Farnesoid X receptor |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GO | Gene ontology |
| GPCR | G-protein-coupled receptor |
| HAEC | Human aortic endothelial cells |
| HCAEC | Human coronary artery endothelial cells |
| HDL | High density lipoprotein |
| hHDL | Human HDL |
| HDL-C | HDL cholesterol |
| HER | Human Embryonic Retinoblasts |
| HIF-1 α | Hypoxia-inducible factor 1-alpha |
| HL | Hepatic lipase |
| HMG-CoA | 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A |
| HMEC | Human microvascular endothelial cells |
| HMVEC | Human microvascular endothelial cells |

| | |
|----------------|---|
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HPAEC | Human placental arterial endothelial cells |
| HO-1 | Heme oxygenase-1 |
| HRMEC | Human retinal microvascular endothelial cells |
| HSPGs | Heparan sulfate proteoglycans |
| HUVEC | Human umbilical vein endothelial cells |
| ICAM-1 | Intracellular adhesion molecule-1 |
| ID1 | Inhibitor of DNA binding 1, HLH protein |
| IDL | Intermediate density lipoproteins |
| IFN- γ | Interferon gamma |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-8 | Interleukin 8 |
| iNOS | Inducible NOS |
| IPA | Ingenuity pathway analysis |
| IPTG | Isopropylthio- β -galactoside |
| ITGA-4 | Integrin subunit alpha 4 |
| JAK2 | c-Jun N-terminal kinase-2 |
| JAM-A | Junctional adhesion molecule 2 |
| JNK-1 | c-Jun N-terminal kinase |
| 7-KC | Oxysterol 7-ketocholesterol |
| LCAT | Lecithin:cholesterol acyl transferase |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LDL-C | LDL cholesterol |
| LDLR | LDL receptor |
| LKB1 | Liver kinase B1 (serine-threonine kinase B1) |
| LOX-1 | Lectin-like oxidized LDL receptor-1 |
| LPC | Lysophosphatidylcholine |
| LPDS | Lipoprotein deficient serum |
| LPL | Lipoprotein lipase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRP | LDL-receptor-related protein |
| LSF | Lysosulfatide |
| LXR | Liver X receptor |
| MAPKAPK2/3 | MAP kinase-activated protein kinase 2/3 |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 |
| MDA | Malondialdehyde |
| MEK1/2 | Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| miRNAs | microRNAs |
| MMPs | Matrix metalloproteinases |
| Ni-NTA | Ni ²⁺ (Nickel)-nitrilotriacetic acid |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| nNOS | Neuronal nitric oxide synthase |
| NO | Nitric oxide |
| NOTCH1 | Notch receptor 1 |
| NOX-1 | NADPH oxidase 1 |
| oxLDL | Oxidized LDL |

| | |
|---------------|--|
| PA | Phosphatidic acid |
| PAEC | Porcine aortic endothelial cells |
| PAF | Platelet activating factor |
| PAF-AH | Platelet-activating factor acetylhydrolase |
| PAGGE | Polyacrylamide gradient gel electrophoresis |
| PAI-1 | Plasminogen activator inhibitor type 1 |
| PAPC | 1-palmitoyl-2-arachidonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| PC | Phosphatidylcholine |
| PCA | Principal components analysis |
| PCC | Pearson's correlation coefficient |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PCSK9 | Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| PDZK1 | PDZ domain-containing protein 1 |
| PE | Phosphatidylethanolamine |
| PECAM-1 | Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 |
| PG | Phosphatidylglycerol |
| PGI2 | Prostaglandin I2 (Prostacyclin) |
| PHA | Phytohemagglutinin |
| PHD2/3 | Prolyl hydroxylase domain-containing protein 2/3 |
| PI | Phosphatidylinositol |
| PIK3CG | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase |
| PKA/G | cAMP-dependent protein kinase A/G |
| p27 (Kip1) | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B |
| PLC | Phospholipase C |
| PLOOH | Lipid hydroperoxides |
| PLPC | 1-palmitoyl-2-linoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| PLTP | Phospholipid transfer protein |
| PMSF | Phenylmethanesulfonyl fluoride |
| p38 MAPK | p38 Mitogen activated protein kinase |
| POPC | 1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| PON1/2/3 | Paraoxonase 1/2/3 |
| PPAR γ | Peroxisome proliferator-activated receptor γ |
| PPARD | Peroxisome proliferator activated receptor delta |
| P2RY1-ADP | Purinergic receptor P2Y1 |
| PS | Phosphatidylserine |
| PTGIR | Prostaglandin I2 (Prostacyclin) receptor |
| Rac1 | Rac family small GTPase 1 |
| RAEC | Rabbit aortic bovine aortic endothelial cells |
| Raf-1 | Raf-1 proto-pncogene, serine/threonine kinase |
| Ras | Ras proto-oncogene, GTPase |

| | |
|------------------------|--|
| RB | Retinoblastoma protein |
| RCT | Reverse cholesterol transport |
| Retinoblastoma protein | Ρετινοβλάστωμα |
| rHDL | Reconstituted HDL |
| RhoA | Ras homolog family member A |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SAA | Serum amyloid A |
| SEM | Standard error of the mean |
| Siah1/2 | Siah E3 ubiquitin protein ligase 1/2 |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SM | Sphingomyelin |
| SPC | Sphingosylphosphorylcholine |
| SR-A | Scavenger receptor class A |
| SR-BI | Scavenger receptor class BI |
| Src | SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase |
| S1P | Sphingosine-1-phosphate |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| tBid | Truncated BH3 interacting domain death agonist |
| TC | Total cholesterol |
| TEMED | Tetramethylethylenediamine |
| TF | Tissue factor |
| TFPI | Tissue factor pathway inhibitor |
| TGF- β 2 | Transforming growth factor- β 2 |
| TLR4 | Toll-like receptor 4 |
| TNF-a | Tumor necrosis factor-a |
| t-PA | Tissue plasminogen activator |
| tRNAs | Transfer RNAs |
| Trx | Thioredoxin |
| TXA2 | Thromboxane A2 |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule-1 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VEGFR2 | Vascular endothelial growth factor receptor 2 |
| VLDL | Very low density lipoproteins |
| VSMCs | Vascular smooth muscle cells |
| WHO | World health organization |
| vWF | von Willebrand factor |

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Μετάγραφα με στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένη έκφραση μεταξύ των HAEC κυττάρων που επώαστηκαν με την rHDL-apoE3 και του δείγματος αναφοράς PBS, τα οποία προέκυψαν από τα πειράματα των μικροσυστοιχιών χρησιμοποιώντας τα εξής κριτήρια βιοπληροφορικής ανάλυσης: λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης $FC \geq |2,00|$ και $FDR \leq 0,05$. Τα μετάγραφα που υπερεκφράστηκαν ή υποεκφράστηκαν μετά την έκθεση των HAEC κυττάρων στην rHDL-apoE3 κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση το λόγο αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC.

| Σύμβολο γονιδίου | Πλήρες όνομα γονιδίου | Λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC |
|--|---|--------------------------------------|
| Στατιστικώς σημαντικά υπερεκφραζόμενα γονίδια | | |
| CYP1A1 | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 | 7,739 |
| ANGPTL4 | angiopoietin-like 4 | 5,281 |
| ADAMTS4 | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4 | 5,099 |
| PRDM1 | PR domain containing 1, with ZNF domain | 4,841 |
| LIPG | lipase, endothelial | 4,590 |
| PLVAP | plasmalemma vesicle associated protein | 4,452 |
| ST8SIA4 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4 | 3,804 |
| VAV3 | vav 3 guanine nucleotide exchange factor | 3,787 |
| ADAMTS1 | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 | 3,757 |
| SULT1C4 | sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 4 | 3,637 |
| UNC5B | unc-5 homolog B (C. elegans) | 3,570 |
| FABP4 | fatty acid binding protein 4, adipocyte | 3,373 |
| RAPGEF4 | Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 | 3,276 |
| EHD3 | EH-domain containing 3 | 3,262 |
| SNAI1 | snail homolog 1 (Drosophila) | 3,163 |
| TSPAN13 | tetraspanin 13 | 3,154 |
| PCDH17 | protocadherin 17 | 3,129 |
| SPRY4 | sprouty homolog 4 (Drosophila) | 3,067 |
| EFNB2 | ephrin-B2 | 3,032 |
| RASGRP3 | RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated) | 3,013 |
| HEY2 | hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2 | 2,998 |
| DOCK8 | dedicator of cytokinesis 8 | 2,879 |
| PRR5L | proline rich 5 like | 2,832 |
| FLT1 | fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability | 2,768 |

| | | |
|----------|---|-------|
| | factor receptor) | |
| CHST11 | carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11 | 2,717 |
| RGS5 | regulator of G-protein signaling 5 | 2,702 |
| DKK2 | dickkopf homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>) | 2,697 |
| RAPGEF5 | Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5 | 2,697 |
| HECW2 | HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 | 2,681 |
| PALD1 | phosphatase domain containing, paladin 1 | 2,665 |
| GPR37 | G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like) | 2,642 |
| CRELD2 | cysteine-rich with EGF-like domains 2 | 2,566 |
| ID1 | inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein | 2,522 |
| JAG2 | jagged 2 | 2,507 |
| A2M | alpha-2-macroglobulin | 2,493 |
| ITGA11 | integrin, alpha 11 | 2,473 |
| LPAR6 | lysophosphatidic acid receptor 6 | 2,453 |
| ACE | angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1 | 2,452 |
| HES1 | hairy and enhancer of split 1, (<i>Drosophila</i>) | 2,440 |
| PTGS2 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | 2,436 |
| MEF2C | myocyte enhancer factor 2C | 2,433 |
| VIPR1 | vasoactive intestinal peptide receptor 1 | 2,424 |
| RNF122 | ring finger protein 122 | 2,407 |
| PMEP1 | prostate transmembrane protein, androgen induced 1 | 2,373 |
| HLX | H2.0-like homeobox | 2,367 |
| RASGRF2 | Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2 | 2,365 |
| EGR1 | early growth response 1 | 2,363 |
| SIRPB2 | signal-regulatory protein beta 2 | 2,349 |
| TNS3 | tensin 3 | 2,348 |
| TMEM204 | transmembrane protein 204 | 2,346 |
| DDI2 | DNA-damage inducible 1 homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>) | 2,345 |
| CYB561 | cytochrome b-561 | 2,339 |
| CPNE5 | copine V | 2,328 |
| SLC39A10 | solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10 | 2,328 |
| NEDD9 | neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 | 2,325 |
| PNPLA3 | patatin-like phospholipase domain containing 3 | 2,315 |
| SIPA1L2 | signal-induced proliferation-associated 1 like 2 | 2,312 |
| PIK3CG | phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide | 2,238 |
| PDGFD | platelet derived growth factor D | 2,207 |
| KIAA1147 | KIAA1147 | 2,173 |

| | | |
|---|---|--------|
| EXOC3L1 | exocyst complex component 3-like 1 | 2,166 |
| TFPI2 | tissue factor pathway inhibitor 2 | 2,166 |
| PCDH12 | protocadherin 12 | 2,165 |
| DNM3 | dynamamin 3 | 2,152 |
| PPAP2B | phosphatidic acid phosphatase type 2B | 2,149 |
| ABI3 | ABI family, member 3 | 2,145 |
| COL4A1 | collagen, type IV, alpha 1 | 2,139 |
| CHST1 | carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1 | 2,138 |
| RSC1A1 | regulatory solute carrier protein, family 1, member 1 | 2,138 |
| F2RL3 | coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3 | 2,128 |
| SOCS3 | suppressor of cytokine signaling 3 | 2,094 |
| NEK10 | NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 10 | 2,093 |
| HSD17B7 | hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7 | 2,089 |
| VTRNA1-3 | vault RNA 1-3 | 2,081 |
| IFFO2 | intermediate filament family orphan 2 | 2,078 |
| LFNG | LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase | 2,077 |
| KIAA0040 | KIAA0040 | 2,066 |
| RASD1 | RAS, dexamethasone-induced 1 | 2,052 |
| DLL4 | delta-like 4 (Drosophila) | 2,047 |
| NR4A1 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 | 2,047 |
| TMEM37 | transmembrane protein 37 | 2,041 |
| INSIG1 | insulin induced gene 1 | 2,032 |
| HMGCS1 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble) | 2,026 |
| ETV1 | ets variant 1 | 2,021 |
| FRRS1 | ferric-chelate reductase 1 | 2,020 |
| TRAF3IP2 | TRAF3 interacting protein 2 | 2,015 |
| LAPTM5 | lysosomal protein transmembrane 5 | 2,010 |
| FHOD1 | formin homology 2 domain containing 1 | 2,009 |
| PNP | purine nucleoside phosphorylase | 2,007 |
| Στατιστικώς σημαντικά υποεκφραζόμενα γονίδια | | |
| TGM2 | transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase) | -2,000 |
| CXADR | coxsackie virus and adenovirus receptor | -2,001 |
| MELK | maternal embryonic leucine zipper kinase | -2,001 |
| TMEM163 | transmembrane protein 163 | -2,006 |
| C17orf58 | chromosome 17 open reading frame 58 | -2,007 |
| IL1RL1 | interleukin 1 receptor-like 1 | -2,028 |
| HIST1H2BE | histone cluster 1, H2be | -2,039 |
| IQGAP3 | IQ motif containing GTPase activating protein 3 | -2,047 |
| SCN5A | sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit | -2,049 |
| NTN4 | netrin 4 | -2,053 |
| ABCA6 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6 | -2,060 |

| | | |
|-----------|---|--------|
| EDNRB | endothelin receptor type B | -2,063 |
| BRIP1 | BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 | -2,065 |
| PRKAA2 | protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit | -2,073 |
| DPF3 | D4, zinc and double PHD fingers, family 3 | -2,077 |
| HIST1H2AB | histone cluster 1, H2ab | -2,079 |
| MID2 | midline 2 | -2,081 |
| STAT1 | signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa | -2,084 |
| KLHDC8B | kelch domain containing 8B | -2,091 |
| CDK1 | cyclin-dependent kinase 1 | -2,100 |
| KIF23 | kinesin family member 23 | -2,113 |
| SQRDL | sulfide quinone reductase-like (yeast) | -2,116 |
| PHLDB2 | pleckstrin homology-like domain, family B, member 2 | -2,117 |
| SESN3 | sestrin 3 | -2,121 |
| HMMR | hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) | -2,124 |
| FHL2 | four and a half LIM domains 2 | -2,127 |
| SGOL1 | shugoshin-like 1 (<i>S. pombe</i>) | -2,128 |
| MKI67 | antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 | -2,128 |
| FLRT2 | fibronectin leucine rich transmembrane protein 2 | -2,138 |
| MME | membrane metallo-endopeptidase | -2,139 |
| FRMD5 | FERM domain containing 5 | -2,140 |
| WARS | tryptophanyl-tRNA synthetase | -2,143 |
| DDX60L | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like | -2,144 |
| MAP3K5 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 | -2,147 |
| HYI | hydroxypyruvate isomerase (putative) | -2,152 |
| CD274 | CD274 molecule | -2,156 |
| HIST1H1B | histone cluster 1, H1b | -2,161 |
| DIAPH3 | diaphanous homolog 3 (<i>Drosophila</i>) | -2,173 |
| KIF11 | kinesin family member 11 | -2,175 |
| SULT1B1 | sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1 | -2,201 |
| NEXN | nexilin (F actin binding protein) | -2,207 |
| ABCA9 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9 | -2,207 |
| PTGIR | prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP) | -2,212 |
| KIF15 | kinesin family member 15 | -2,227 |
| SLC30A1 | solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 | -2,227 |
| NUF2 | NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | -2,227 |
| GINS2 | GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog) | -2,245 |
| ZNF385D | zinc finger protein 385D | -2,250 |
| NCAPG | non-SMC condensin I complex, subunit G | -2,260 |
| ZNF641 | zinc finger protein 641 | -2,266 |
| MAL2 | mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene) | -2,276 |
| ENOX1 | ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1 | -2,277 |

| | | |
|-----------|--|--------|
| THSD7A | thrombospondin, type I, domain containing 7A | -2,283 |
| PTGIS | prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase | -2,284 |
| TNFSF18 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18 | -2,291 |
| ASPM | asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila) | -2,297 |
| TOP2A | topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa | -2,321 |
| HIST1H2AI | histone cluster 1, H2ai | -2,327 |
| PBK | PDZ binding kinase | -2,330 |
| HIST1H2BB | histone cluster 1, H2bb | -2,337 |
| MT1X | metallothionein 1X | -2,349 |
| AQP1 | aquaporin 1 (Colton blood group) | -2,352 |
| RALGPS2 | Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2 | -2,374 |
| NRG1 | neuregulin 1 | -2,390 |
| APOBEC3B | apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B | -2,412 |
| GPRC5A | G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A | -2,434 |
| ANXA3 | annexin A3 | -2,441 |
| CKAP2L | cytoskeleton associated protein 2-like | -2,448 |
| SHISA3 | shisa homolog 3 (Xenopus laevis) | -2,480 |
| MT1F | metallothionein 1F | -2,518 |
| CXCL11 | chemokine (C-X-C motif) ligand 11 | -2,531 |
| NDRG4 | NDRG family member 4 | -2,540 |
| GCNT1 | glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 | -2,564 |
| HIST1H3G | histone cluster 1, H3g | -2,606 |
| KLHL13 | kelch-like 13 (Drosophila) | -2,611 |
| CELF2 | CUGBP, Elav-like family member 2 | -2,613 |
| SDPR | serum deprivation response | -2,623 |
| HIST1H2BM | histone cluster 1, H2bm | -2,684 |
| UCP2 | uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) | -2,722 |
| ANKRD1 | ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) | -2,734 |
| ESCO2 | establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae) | -2,738 |
| TGFB2 | transforming growth factor, beta 2 | -2,741 |
| ADGRG6 | adhesion G protein-coupled receptor G6 | -2,741 |
| CCBE1 | collagen and calcium binding EGF domains 1 | -2,772 |
| FST | follistatin | -2,785 |
| HIST1H2BF | histone cluster 1, H2bf | -2,864 |
| SULT1E1 | sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1 | -2,892 |
| TMOD1 | tropomodulin 1 | -2,918 |
| CLDN11 | claudin 11 | -2,950 |
| RSPO3 | R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis) | -2,969 |
| LYVE1 | lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 | -2,986 |
| TMEM88 | transmembrane protein 88 | -2,999 |
| MTMR10 | myotubularin related protein 10 | -3,003 |
| ITGB8 | integrin, beta 8 | -3,174 |

| | | |
|----------|--|--------|
| FAM189A2 | family with sequence similarity 189, member A2 | -3,605 |
| DKK1 | dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>) | -3,649 |
| NSAP11 | nervous system abundant protein 11 | -3,664 |
| CYP4X1 | cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1 | -3,776 |
| DHRS3 | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 | -3,813 |
| MAMDC2 | MAM domain containing 2 | -3,879 |
| RARB | retinoic acid receptor, beta | -3,919 |
| NUPR1 | nuclear protein, transcriptional regulator, 1 | -4,361 |
| IL8 | interleukin 8 | -4,411 |
| MT1E | metallothionein 1E | -4,511 |
| CXCL1 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | -4,860 |
| HTR1B | 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B | -5,091 |
| MGARP | mitochondria localized glutamic acid rich protein | -5,324 |
| AK5 | adenylate kinase 5 | -6,771 |
| PTX3 | pentraxin 3, long | -7,861 |

Πίνακας 2: Στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένες ($P \leq 0,05$) Βιολογικές και Μοριακές λειτουργίες που εντοπίζονται μεταξύ των HAEC κυττάρων που εκτέθηκαν στην rHDL-αποΕ3 και του δείγματος αναφοράς PBS. Για κάθε μία από τις 23 αυτές λειτουργίες παρουσιάζονται τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια που κατηγοριοποιούνται σε αυτήν. Οι εν λόγω λειτουργίες προέκυψαν από την «Ανάλυση Βιολογικών και Μοριακών Λειτουργιών» του λογισμικού IPA και κατατάσσονται με βάση την τιμή P -value, η οποία υπολογίστηκε από το right-tailed Fisher's Exact τεστ.

| Βιολογικές και Μοριακές Λειτουργίες | | |
|---|---|---|
| Λειτουργική κατηγορία IPA | P-value | Στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια |
| Κυτταρική Κίνηση Αριθμός γονιδίων: 64 | $5,69 \times 10^{-15}$ - $6,11 \times 10^{-3}$ | KIF23, SOCS3, HMMR, DIAPH3, UNC5B, CXCL1, ETV1, NEXN, PBK, ST8SIA4, FHL2, TRAF3IP2, PIK3CG, CD274, PRDM1, SULT1E1, LYVE1, SCN5A, PTX3, IL8, HLX, FST, JAG2, COL4A1, SNAI1, AQP1, TFPI2, KLHL13, GCNT1, ABI3, PDGFD, CLDN11, NTN4, IL1RL1, NRG1, MAP3K5, ITGB8, TGM2, ID1, EFNB2, ANGPTL4, VIPR1, PPAP2B, TOP2A, TGFB2, FABP4, STAT1, CXCL11, PTGIR, UCP2, EDNRB, EGR1, FLT1, CDK1, CHST1, WARS, VAV3, ANXA3, PTGS2, DKK1, DLL4, A2M, NEDD9, CXADR |
| Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός Αριθμός γονιδίων: 75 | $2,98 \times 10^{-11}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | KIF23, SOCS3, INSIG1, HMMR, NCAPG, UNC5B, CXCL1, ETV1, MELK, HES1, MKI67, PBK, ST8SIA4, FHL2, ITGA11, PIK3CG, NUPR1, CHST11, PRDM1, CD274, SULT1E1, HEY2, SCN5A, PTX3, IL8, HLX, FST, JAG2, COL4A1, ADAMTS1, MT1X, AQP1, TFPI2, RASD1, RASGRF2, ANKRD1, GCNT1, PNP, LFNG, PDGFD, KIF11, MT1E, |

| | | |
|---|---|---|
| | | PMEPA1, LAPTM5, NTN4, IL1RL1, NRG1, ITGB8, TGM2, EFNB2, ID1, ANGPTL4, VIPR1, RARB, TGFB2, STAT1, CYP1A1, PTGIR, EDNRB, EGR1, FLT1, CDK1, TNFSF18, WARS, TNS3, KIF15, VAV3, NR4A1, MEF2C, DKK1, PTGS2, NEDD9, A2M, CXADR, DLL4 |
| Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση Αριθμός γονιδίων: 63 | $2,76 \times 10^{-10}$ - $5,91 \times 10^{-3}$ | SOCS3, HMMR, UNC5B, CXCL1, MELK, HES1, PBK, ST8SIA4, TRAF3IP2, FHL2, GPR37, PIK3CG, NUPR1, CHST11, PRDM1, CD274, PTGIS, IL8, JAG2, COL4A1, FST, MT1X, SNAI1, AQP1, RASD1, ANKRD1, GCNT1, PNP, MT1E, PMEPA1, MME, NTN4, NRG1, RAPGEF4, MAP3K5, NUF2, TGM2, EFNB2, ID1, ANGPTL4, RGS5, VIPR1, RARB, TOP2A, TGFB2, PRKAA2, STAT1, CXCL11, UCP2, EDNRB, FLT1, EGR1, CDK1, TNFSF18, AK5, VAV3, NR4A1, MEF2C, DKK1, PTGS2, NEDD9, CXADR, DLL4 |
| Κυτταρική Ανάπτυξη Αριθμός γονιδίων: 54 | $3,64 \times 10^{-10}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | SOCS3, INSIG1, HMMR, UNC5B, CXCL1, ETV1, HES1, SPRY4, FHL2, ST8SIA4, PIK3CG, CHST11, DKK2, PRDM1, CD274, SULT1E1, HEY2, IL8, JAG2, COL4A1, FST, ADAMTS1, TFPI2, RASD1, GCNT1, PNP, LFNG, PMEPA1, IL1RL1, NRG1, ITGB8, TGM2, ID1, EFNB2, ANGPTL4, ASPM, RARB, TGFB2, FABP4, STAT1, CXCL11, CYP1A1, PTGIR, EDNRB, EGR1, FLT1, VAV3, NR4A1, MEF2C, DKK1, PTGS2, CXADR, DLL4, A2M |
| Φλεγμονώδης Απόκριση Αριθμός γονιδίων: 44 | $2,61 \times 10^{-7}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | MME, SOCS3, LAPTM5, IL1RL1, NRG1, UNC5B, CXCL1, MAP3K5, PBK, TGM2, EFNB2, FHL2, TRAF3IP2, VIPR1, PIK3CG, TOP2A, NUPR1, TGFB2, FABP4, CD274, PRDM1, STAT1, ACE, SCN5A, CXCL11, PTX3, IL8, PTGIR, COL4A1, UCP2, EDNRB, FLT1, EGR1, RASGRP3, GCNT1, VAV3, ANXA3, PNP, MEF2C, PTGS2, DLL4, CXADR, NEDD9, MT1E |
| Κυτταρική Λειτουργία και Διατήρηση Αριθμός γονιδίων: 44 | $4,52 \times 10^{-6}$ - $5,54 \times 10^{-3}$ | SOCS3, NTN4, IL1RL1, CXCL1, ITGB8, TGM2, ID1, GPR37, PIK3CG, TGFB2, PRKAA2, NUPR1, FABP4, SULT1E1, LIPG, CD274, PRDM1, STAT1, SLC30A1, SCN5A, IL8, PTGIR, COL4A1, JAG2, UCP2, EDNRB, EGR1, FLT1, AQP1, RASGRF2, VAV3, PNP, LFNG, MEF2C, PTGS2, DKK1, NEDD9, DLL4, MT1E |
| Γονιδιακή Έκφραση Αριθμός γονιδίων: 21 | $8,43 \times 10^{-5}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | IL8, SOCS3, CYP1A1, UCP2, EGR1, NRG1, DDX60L, HES1, CDK1, RASGRF2, ID1, FHL2, PIK3CG, RARB, NR4A1, FABP4, PRDM1, PTGS2, HEY2, STAT1, CXADR |
| Κυτταρική Μορφολογία Αριθμός γονιδίων: 43 | $8,51 \times 10^{-5}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | KIF23, NTN4, DIAPH3, NRG1, CXCL1, ETV1, ITGB8, HES1, ID1, ANGPTL4, ST8SIA4, MT1F, PIK3CG, ADGRG6, RARB, TGFB2, DKK2, SULT1E1, CD274, PRDM1, HEY2, STAT1, ADAMTS4, IL8, HLX, COL4A1, FST, JAG2, EDNRB, EGR1, FLT1, SNAI1, RASGRF2, ANKRD1, GCNT1, VAV3, NR4A1, LFNG, PTGS2, TMOD1, CXADR, DLL4, MT1E |

| | | |
|---|--|---|
| Δέσμευση Ελεύθερων Ριζών | $8,51 \times 10^{-5}$ - $4,57 \times 10^{-3}$ | TGM2, IL8, CYP1A1, SESN3, UCP2, PIK3CG, PRKAA2, MAP3K5, PBK |
| Αριθμός γονιδίων: 9 | | |
| Μοριακή Μεταφορά | $8,51 \times 10^{-5}$ - $6,11 \times 10^{-3}$ | SOCS3, INSIG1, MAP3K5, PBK, ANGPTL4, PPAP2B, PIK3CG, NUPR1, PRKAA2, FABP4, SULT1E1, LIPG, STAT1, ACE, CXCL11, PTGIS, IL8, FST, PTGIR, UCP2, EDNRB, RSC1A1, EGR1, AQP1, RASGRP3, F2RL3, VAV3, NR4A1, PTGS2, NEDD9, TMOD1, A2M, MT1E |
| Αριθμός γονιδίων: 33 | | |
| Μεταβολισμός Λιπιδίων | $1,07 \times 10^{-4}$ - $6,11 \times 10^{-3}$ | SOCS3, SULT1C4, INSIG1, UNC5B, NRG1, CXCL1, ITGB8, ST8SIA4, ANGPTL4, VIPR1, PIK3CG, PPAP2B, PRKAA2, FABP4, LIPG, SULT1E1, ACE, PTGIS, PTX3, IL8, CYP1A1, FST, PTGIR, UCP2, PNPLA3, RSC1A1, FLT1, EGR1, HSD17B7, F2RL3, VAV3, NR4A1, PTGS2, MT1E |
| Αριθμός γονιδίων: 34 | | |
| Βιοχημεία Μικρών Μορίων | $1,07 \times 10^{-4}$ - $6,11 \times 10^{-3}$ | SOCS3, SULT1C4, INSIG1, UNC5B, NRG1, CXCL1, ITGB8, ANGPTL4, ST8SIA4, HTR1B, VIPR1, PPAP2B, PIK3CG, NUPR1, PRKAA2, TGFB2, FABP4, CHST11, LIPG, SULT1E1, STAT1, SLC30A1, ACE, PTX3, PTGIS, IL8, CYP1A1, FST, PTGIR, UCP2, RSC1A1, PNPLA3, EGR1, FLT1, HSD17B7, AQP1, CDK1, F2RL3, AK5, VAV3, NR4A1, PNP, PTGS2, SULT1B1, MT1E |
| Αριθμός γονιδίων: 45 | | |
| Διακυτταρική Σηματοδότηση και Επικοινωνία | $2,21 \times 10^{-4}$ - $5,20 \times 10^{-3}$ | MME, IL1RL1, NRG1, CXCL1, TGM2, EFNB2, TRAF3IP2, FHL2, VIPR1, PIK3CG, TGFB2, LIPG, STAT1, ACE, CXCL11, SCN5A, PTX3, IL8, PTGIR, UCP2, FLT1, TNFSF18, F2RL3, CHST1, GCNT1, NR4A1, LFNG, A2M, CXADR |
| Αριθμός γονιδίων: 29 | | |
| Κυτταρικός Κύκλος | $2,38 \times 10^{-4}$ - $6,61 \times 10^{-3}$ | KIF23, KLHL13, ASPM, EGR1, DIAPH3, VAV3, NRG1, TOP2A, HES1, NUF2, CDK1 |
| Αριθμός γονιδίων: 11 | | |
| Κυτταρική Σηματοδότηση | $3,91 \times 10^{-4}$ - $6,24 \times 10^{-3}$ | PTX3, SOCS3, IL8, UCP2, EDNRB, FLT1, NRG1, MAP3K5, TGM2, ID1, RASGRP3, F2RL3, VAV3, PIK3CG, MEF2C, PTGS2, STAT1, A2M, TMOD1, CXCL11 |
| Αριθμός γονιδίων: 20 | | |
| Μεταβολισμός Υδατανθράκων | $4,56 \times 10^{-4}$ - $5,23 \times 10^{-3}$ | PTX3, SOCS3, IL8, FLT1, UNC5B, NRG1, AQP1, F2RL3, CHST1, ST8SIA4, VIPR1, PIK3CG, PPAP2B, TGFB2, PRKAA2, NR4A1, FABP4, CHST11, LIPG, LYVE1, PCDH12, CXADR, MT1E |
| Αριθμός γονιδίων: 23 | | |
| Διαταραγμένη Κυτταρική Λειτουργία | $1,05 \times 10^{-3}$ - $5,20 \times 10^{-3}$ | KIF23, IL8, RASGRF2, GPR37, FLT1, PIK3CG, DIAPH3, CXCL1, MEF2C, PTGS2, MT1E |
| | | |

| | | |
|--|--|---|
| (Cellular Compromise) | | |
| Αριθμός γονιδίων: 11 | | |
| Μεταβολισμός Φαρμάκων | 1,05x10 ⁻³ - 4,57x10 ⁻³ | PTGIS, SULT1C4, NRG1, PRKAA2, FABP4, SULT1E1, PTGS2 |
| Αριθμός γονιδίων: 7 | | |
| Κυτταρική Συγκρότηση και Οργάνωση | 1,10x10 ⁻³ - 3,68x10 ⁻³ | MME, TGM2, UCP2, FLT1, PRKAA2, PNP, NUF2, SGO1, A2M, DLL4, ACE |
| Αριθμός γονιδίων: 11 | | |
| Μεταβολισμός Νουκλεϊκών Οξέων | 1,43x10 ⁻³ - 6,59x10 ⁻³ | SOCS3, CYP1A1, AK5, HTR1B, PTGIR, PIK3CG, PRKAA2, PNP, AQP1, PTGS2, CDK1 |
| Αριθμός γονιδίων: 11 | | |
| Αντιγονο- παρουσίαση | 1,46x10 ⁻³ - 5,2x10 ⁻³ | PTX3, TGM2, IL8, EDNRB, VIPR1, FLT1, PIK3CG, TGFB2, CXCL1, MAP3K5, PTGS2, CXADR, SCN5A |
| Αριθμός γονιδίων: 13 | | |
| Αντιγραφή DNA, Μετασχηματισμός και Επιδιόρθωση DNA | 1,99x10 ⁻³ - 1,99x10 ⁻³ | IL8, FLT1, SNAI1, NRG1, NR4A1, TGFB2, PTGS2, PDGFD, A2M, TFPI2 |
| Αριθμός γονιδίων: 10 | | |
| Μεταβολισμός Βιταμινών και Μετάλλων | 2,48x10 ⁻³ - 2,48x10 ⁻³ | F2RL3, RASGRP3, IL8, EDNRB, PIK3CG, VAV3, PTGS2, A2M, TMOD1, CXCL11 |
| Αριθμός γονιδίων: 10 | | |

Πίνακας 3: Δίκτυα στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται το σύνολο των γονιδίων (τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3 και τα γονίδια που δεν αλλάζουν έκφραση) που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν το εκάστοτε δίκτυο. Στη δεύτερη στήλη αναγράφεται η τιμή Σκορ του εκάστοτε δικτύου και στην τρίτη στήλη ο αριθμός των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που περιέχονται σε κάθε δίκτυο. Στην τέταρτη στήλη παρουσιάζονται οι στατιστικώς σημαντικότερες βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών του εκάστοτε δικτύου. Τα δίκτυα προέκυψαν από την «Ανάλυση Δικτύων» του λογισμικού IPA και κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση την τιμή Σκορ.

| | Γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του Δικτύου | Τιμή Σκορ του Δικτύου | Αριθμός στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων γονιδίων του Δικτύου | Στατιστικώς σημαντικότερες βιολογικές λειτουργίες του Δικτύου |
|---|---|------------------------------|--|--|
| 1 | 14-3-3, A2M, AQP1, DKK1, EGR1, ERK1/2, FLT1, FST, Hdac, HES1 (includes EG:15205), Histone h4, HLX, ID1, IL1, Jnk, MAP3K5, MT1E, MT1F, NDRG4, Notch, NR4A1, P38 MAPK, PARP, PBK, PDGF BB, PTGS2, RASGRP3, SNAI1, SOCS3, SPRY4, SULT1E1, TOP2A, UCP2, UNC5B, VEGF | 37 | 24 | Ασθένειες Αναπαραγωγικού Συστήματος, Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση, Σύνδρομο Ενδοκρινικού Συστήματος |
| 2 | Akt, Alp, CD3, CD274, Creb, CYP1A1, DDX60L, DHRS3, ERK, F2RL3, FABP4, FHL2,FSH, Gm-csf, GPRC5A, hCG, Histone h3, Hsp70, IgG, IL12 (complex), MEF2C, MT1X, PPAP2B, PRDM1, PRKAA2, PTX3, RARB, RGS5, RNA polymerase II, SESN3, STAT1, TCR, TGFB2, TGM2, VIPR1 | 31 | 21 | Ανάπτυξη Ιστών, Εμβρυική Ανάπτυξη, Ανάπτυξη Οργάνων |
| 3 | ADAMTS1, Ap1, BCR, COL4A1, CXCL1, | 27 | 19 | Κυτταρική Κίνηση, |

| | | | | |
|---|---|----|----|---|
| | CXCL11, Cyclin A, DLL4, EDNRB, EFNB2, estrogen receptor, Fibrinogen, Focal adhesion kinase, HMMR, Hsp27, IL8, IL1RL1, Immunoglobulin, ITGB8, LDL, LYVE1, MAP2K1/2, NFkB (complex), Nr1h, NRG1 (includes EG:112400), PI3K (complex), PIK3CG, Pkc(s), PNP, Rac, Ras, TFPI2, TNFSF18, TRAF3IP2, VAV3 | | | Ανάπτυξη και Λειτουργία Καρδιαγγειακού Συστήματος, Ανάπτυξη Οργανισμού |
| 4 | ADAMTS4, AIMP1, APOBEC3B, Calmodulin, CCR8, CD200, CD200R1, CFD, Collagen(s), CPNE5, CRELD2, CXCL1, GPR126, HEY2, HSD17B7, HTR1B, IL5, IL1RL1, JAG2, KIAA1147, LFNG, LYVE1, miR-208b-3p/miR-208/miR-208a-3p (includes others), MT1E, MVP, NOTCH1, PTGIR, RASGRF2, RORA, TBXA2R, TNF, TNFRSF25, VTRNA1-1, VTRNA1-2, VTRNA1-3 | 25 | 18 | Διακυτταρική Σηματοδότηση και Επικοινωνία, Ανάπτυξη και Λειτουργία Αιματολογικού Συστήματος, Χημειοταξία Κυττάρων Ανοσοποιητικού Συστήματος |
| 5 | CDH4, CDK1, CELF2, COL4A2, CTNNA1, CXCL1, CYB561, DLEU1, E2f, ETV1, EZH2, HECW2, HIST1H2AB/HIST1H2AE, HIST1H2AG (includes others), HIST1H3A (includes others), LAPTM5, MAL2, MAP3K11, MKI67, MME, MT1E, MYC, PKMYT1, PPAP2B, PPP2CB, PRDX1, PTGS2, PTMA, S1PR3, SMAD4, SND1, SQRDL, THBD, TREM1, WNT3 | 23 | 17 | Κυτταρική Ανάπτυξη, Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός, Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση |
| 6 | ADAMTS1, ADORA2B, BMP6, CCL21, CD200, CD274, CXCL1, DLL4, FABP5, FLT1, GPR37, HMGCS1, | 21 | 16 | Διακυτταρική Σηματοδότηση και Επικοινωνία, |

| | | | | |
|---|---|----|----|--|
| | HSPA1A/HSPA1B, IFNG (includes EG:15978), IL13, IL1RL1, LIPG, MBP, Nos, NR3C2 (includes EG:110784), PCDH17, PDGFD, PNPLA3, RAPGEF4, RGS2 (includes EG:19735), SCGB3A1, SDPR, SLC39A10, SPN, SREBF1, ST8SIA4, TLR1, TNFRSF25, TNFRSF12A, VEGFA | | | Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός, Κυτταρική Ανάπτυξη |
| 7 | ADCYAP1 (includes EG:11516), BMI1, BNIP3, BUB1B, CCBE1, CLDN11, CLU, DKK2, FLRT2, GBP1, HIST1H1B, HMMR, ITGA11, ITGB1, KIF11, KIF15, KIF23, Lh, MAP1LC3B, mir-145, NCAPD2, NCAPG, NCAPH, NUPR1, PMEPA1, PRC1 (includes EG:233406), SMC2, SMC4, STK17A, TP53 (includes EG:22059), TPM1 (includes EG:22003), TPX2, TSPAN3, UHRF1, YY1 | 16 | 13 | Αντιγραφή DNA, Ανασυνδυασμός, και Επιδιόρθωση DNA, Κυτταρικός Κύκλος, Κυτταρική Κίνηση |
| 8 | ACE, ADM, ALOX5, ANGPTL4, ANKRD1, ASPM, BARD1, BHLHE40, BRIP1, CCNA2, CD46, CD59 (includes EG:25407), CDH2, CITED2, CKS1B, GCNT1, HIST1H2BB, HLA-DRB1, HRAS, IL2, IL17F, INSIG1, let-7a-5p/let-7f-5p/let-7c (includes others), NEDD9, PPP2R5A, SCN5A, SCNN1B, SGOL1, SNAI1, SUZ12, TGFB1 (includes EG:21803), TNS3, TWIST2, TXNIP, ZEB1 | 16 | 12 | Καρκίνος, Κυτταρική Αύξηση και Πολλαπλασιασμός, Φλεγμονώδης Απόκριση |
| 9 | 26s Proteasome, ABCA9, ARNT, CCND1, CCNT1, CDKN2C, CXADR, DIAPH3, ESR1, EXOC3L1, FHOD1, HBB, HIPK2, HIST2H2BE (includes | 14 | 12 | Γονιδιακή Έκφραση, Καρκίνος, Νευρολογικές Ασθένειες |

| | | | | |
|----|--|---|---|---|
| | others), HNF4A, IKZF1, INSR, KRT18, LRP5, MELK, mir-27,miR-16-5p/miR-15b-5p/miR-497-5p (includes others),N-cor, NFIX, POU2F1, S1PR1, SATB1, SIPA1L2, SLC30A1, SP4, TCF7, TMEM204, TMOD1, UHRF1, WARS | | | |
| 10 | TSPAN13, UPF2 | 2 | 1 | Κυτταρική Ανάπτυξη, Ανάπτυξη και Λειτουργία Σκελετικού και Μυϊκού Συστήματος, Βλάβη και Επιδιόρθωση RNA |
| 11 | ESCO2, IGFBP2 | 2 | 1 | Καρδιαγγειακή Νόσος, Δερματολογικές Ασθένειες, Αναπτυξιακά Σύνδρομα |
| 12 | CENPE, NUF2 | 2 | 1 | Κυτταρική Συγκρότηση και Οργάνωση Κυτταρικό Κύκλος, Αντιγραφή DNA, Ανασυνδυασμός και Επιδιόρθωση DNA |
| 13 | FOXL2, RSPO3 | 2 | 1 | Κυτταρική Ανάπτυξη, Δερματολογικές Ασθένειες, Αναπτυξιακά Σύνδρομα |
| 14 | RALGPS2, WT1 | 2 | 1 | Καρκίνος, Ανάπτυξη και Λειτουργία Καρδιαγγειακού Συστήματος, Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση |
| 15 | RNF122, SOX11 | 2 | 1 | Ανάπτυξη και Λειτουργία Πεπτικού |

| | | | | |
|----|--------------|---|---|---|
| | | | | Συστήματος, Κυτταρικός Θάνατος και Επιβίωση, Ανάπτυξη και Λειτουργία Καρδιαγγειακού Συστήματος |
| 16 | ANXA3, CLDN7 | 2 | 1 | Καρκίνος, Ασθένειες Αναπαραγωγικού Συστήματος, Μορφολογία Όγκου |

Πίνακας 4: Μεταγραφικοί παράγοντες/μεταγραφικοί ρυθμιστές που προβλέπεται ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των αλλαγμένων γονιδίων των HAEC κυττάρων μετά από έκθεση στην rHDL-apoE3. Για κάθε ένα μεταγραφικό παράγοντα/μεταγραφικό ρυθμιστή (1η στήλη) επισημαίνεται ο τύπος του μορίου (3η στήλη) και παρουσιάζονται τα στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια-στόχοι του (5η στήλη) και η τιμή *P*-value που τον χαρακτηρίζει. Το σύνολο των 82 μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών προέκυψαν από την ανάλυση πρόβλεψης μεταγραφικών παραγόντων/μεταγραφικών ρυθμιστών («Ανάλυση μεταγραφικών Ρυθμιστών») του λογισμικού IPA, και κατατάσσονται κατά αύξουσα σειρά με βάση την τιμή *P*-value επικάλυψης. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $P \leq 0,01$.

| Μεταγραφικός Ρυθμιστής (Upstream Regulator) (82 συνολικά) | Λόγος αλλαγής γονιδιακής έκφρασης FC | Τύπος μορίου | P-value επικάλυψης (P-value of overlap) | Στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένα γονίδια-στόχοι |
|---|--------------------------------------|--|---|---|
| KDM5B | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,69 \times 10^{-5}$ | CDK1, HMMR, INSIG1, MT1E, MT1F, MT1X, NEDD9, PBK, TOP2A |
| JUN | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,29 \times 10^{-5}$ | CDK1, IL8, DKK1, FABP4, ITGB8, PTGS2, PTX3, SOCS3, VAV3 |
| NOTCH3 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,83 \times 10^{-4}$ | HES1, ID1, PTX3 |
| Hdac | | Ομάδα αποακετυλασών ιστονών | $2,25 \times 10^{-4}$ | EGR1, MT1E, MT1F, NDRG4, NR4A1 |
| NR1D1 | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $2,72 \times 10^{-4}$ | MEF2C, NUPR1, STAT1 |
| FOXO1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $5,65 \times 10^{-4}$ | ASPM, BRIP1, CDK1, KIF11, NCAPG, PBK |
| NOTCH1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $7,01 \times 10^{-4}$ | EFNB2, FLT1, HES1, HEY2, LYVE1 |
| RNA polymerase II | | Σύμπλοκο | $1,28 \times 10^{-3}$ | CXCL11, IL8, DKK1, FABP4, ID1, MEF2C, PTGS2, RARB, SOCS3 |
| PPARD | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $1,68 \times 10^{-3}$ | ANGPTL4, FABP4, FLT1, PTGS2 |
| PPARG | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $1,81 \times 10^{-3}$ | ANGPTL4, IL8, FABP4, HES1, MKI67, NR4A1, PTGS2, SDPR, UCP2 |
| NOTCH4 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $2,24 \times 10^{-3}$ | HES1, HEY2 |
| AR | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $2,74 \times 10^{-3}$ | EGR1, ETV1, MME, PMEPA1, STAT1, SULT1E1 |
| TP53 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,12 \times 10^{-3}$ | CDK1, COL4A1, CXCL1, IL8, CYP1A1, DKK1, FLRT2, HMMR, ID1, KIF23, NCAPG, PBK, PMEPA1, PRDM1, SNAI1, STAT1, TGFB2, TOP2A, UNC5B |
| EZH2 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,21 \times 10^{-3}$ | CXCL1, CXCL11, IL8, DKK1, MAL2, PTGS2 |
| FOS | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,69 \times 10^{-3}$ | IL8, PRDM1, PTGS2, SOCS3, VAV3 |
| NR4A2 | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $4,31 \times 10^{-3}$ | ETV1, PRKAA2, SESN3 |
| TBX5 | | Μεταγραφικός | $4,61 \times 10^{-3}$ | ANKRD1, MEF2C |

| | | | | |
|---------|--------|--|-----------------------|---|
| | | παράγοντας | | |
| NOTCH2 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,61 \times 10^{-3}$ | HES1, HEY2 |
| LYL1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $6,08 \times 10^{-3}$ | EGR1, ID1 |
| KAT2B | | Άλλο | $6,08 \times 10^{-3}$ | PTGS2, RARB |
| RARB | -3,919 | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $6,08 \times 10^{-3}$ | RARB, STAT1 |
| NFKB1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $6,63 \times 10^{-3}$ | IL8, DLL4, EGR1, PTGS2, PTX3 |
| ELK4 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $7,74 \times 10^{-3}$ | EGR1, NR4A1 |
| HDAC1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $7,76 \times 10^{-3}$ | CDK1, IL8, ID1, PTGS2, TOP2A |
| YY1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $8,44 \times 10^{-3}$ | ANKRD1, DKK2, KIF11, KIF23, MKI67, TGFB2, TGM2, TOP2A |
| Nr1h | | Πυρηνικός υποδοχέας υποοικογένεια 1 ομάδα H | $8,59 \times 10^{-3}$ | CXCL1, IL8, PTGS2 |
| EP300 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,09 \times 10^{-2}$ | FABP4, MKI67, PTGS2, SOCS3 |
| CREBBP | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,09 \times 10^{-2}$ | FABP4, NR4A1, PTGS2, SOCS3 |
| Notch | | Οικογένεια υποδοχέων | $1,24 \times 10^{-2}$ | ANKRD1, HES1, ID1 |
| HDAC2 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,24 \times 10^{-2}$ | DKK1, ITGB8, PTGS2 |
| HDAC3 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,35 \times 10^{-2}$ | IL8, PTGS2, RARB |
| NFIX | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,38 \times 10^{-2}$ | IL8, FABP4 |
| MESP1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,52 \times 10^{-2}$ | SNAI1 |
| SMAD1/5 | | Μέλος 1/5 της οικογένειας SMAD πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος | $1,52 \times 10^{-2}$ | ID1 |
| C/ebp | | Πρωτεΐνες δέσμευσης CCAAT (μεταγραφικοί παράγοντες) | $1,52 \times 10^{-2}$ | PTGS2 |
| TRIM16 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,52 \times 10^{-2}$ | RARB |
| MAML2 | | Άλλο | $1,52 \times 10^{-2}$ | HES1 |
| MAML3 | | Μεταγραφικός | $1,52 \times 10^{-2}$ | HES1 |

| | | | | |
|----------------|--|---|-----------------------|--|
| | | παράγοντας | | |
| MED17 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,52 \times 10^{-2}$ | RARB |
| NFkB (complex) | | Μεταγραφικός παράγοντας (σύμπλοκο) | $1,82 \times 10^{-2}$ | CXCL1, CXCL11, IL8, EDNRB, ITGB8, PTGS2, SOCS3, TFPI2 |
| NKX2-1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,86 \times 10^{-2}$ | SNAI1, TGFB2 |
| RELA | | Μεταγραφικός παράγοντας | $2,00 \times 10^{-2}$ | CXCL1, CXCL11, IL8, PTGS2, PTX3, TFPI2 |
| IKZF1 | | Άλλο | $2,08 \times 10^{-2}$ | ABCA9, EXOC3L1, HES1, VIPR1 |
| MSX2 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $2,41 \times 10^{-2}$ | DKK1, TGFB2 |
| E2f | | Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων | $2,50 \times 10^{-2}$ | CDK1, HIST1H2AB/HIST1H2AE, HIST1H2AG (includes others), HIST1H3A (includes others) |
| FOXO3 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $2,58 \times 10^{-2}$ | IL8, MT1E, UCP2 |
| CEBPB | | Μεταγραφικός παράγοντας | $2,77 \times 10^{-2}$ | IL8, FABP4, FHL2, NDRG4, NUPR1, PTGS2 |
| NFYB | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,01 \times 10^{-2}$ | CDK1, TOP2A |
| Ikb | | Ρυθμιστική υπομονάδα του αναστολέα του συμπλόκου της κινάσης kappaB | $3,03 \times 10^{-2}$ | NR4A1 |
| MTF1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,03 \times 10^{-2}$ | MT1E |
| KLF16 | | Άλλο | $3,03 \times 10^{-2}$ | CYP1A1 |
| Atf | | Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων | $3,03 \times 10^{-2}$ | PTGS2 |
| TGIF1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,03 \times 10^{-2}$ | RARB |
| HBP1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,03 \times 10^{-2}$ | PTGS2 |
| GPBP1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,03 \times 10^{-2}$ | TOP2A |
| MAML1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,03 \times 10^{-2}$ | HES1 |
| STAT3 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,30 \times 10^{-2}$ | IL8, PRDM1, SOCS3, STAT1, WARS |
| N-cor | | Οικογένεια μεταγραφικών αναστολέων | $3,33 \times 10^{-2}$ | PTGS2, RARB |
| FOXC2 | | Άλλο | $3,33 \times 10^{-2}$ | FABP4, PTGS2 |
| NCOA1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,33 \times 10^{-2}$ | FABP4, RARB |

| | | | | |
|---------|--|--|-----------------------|---|
| CUX1 | | Άλλο | $3,33 \times 10^{-2}$ | CXCL1, DKK2 |
| ESR1 | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $3,45 \times 10^{-2}$ | IL8, CYP1A1, FST, PTX3, TMOD1, VAV3 |
| TFAP2A | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,45 \times 10^{-2}$ | CXCL1, GPR37, SESN3 |
| USF1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,64 \times 10^{-2}$ | MT1E, PTGS2, UCP2 |
| NR1I2 | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $3,64 \times 10^{-2}$ | CYP1A1, INSIG1, SULT1E1 |
| NCOR2 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,66 \times 10^{-2}$ | IL8, PTGS2 |
| CREB1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,91 \times 10^{-2}$ | EGR1, FLT1, NR4A1, PTGS2 |
| E2F4 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $3,92 \times 10^{-2}$ | CDK1, HIST1H3A (includes others), HIST2H2BE (includes others), HMMR, MKI67, TOP2A |
| SMARCB1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,01 \times 10^{-2}$ | FABP4, HES1 |
| NKRF | | Άλλο | $4,50 \times 10^{-2}$ | IL8 |
| PHB | | Άλλο | $4,50 \times 10^{-2}$ | IL8 |
| ZFP36 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,50 \times 10^{-2}$ | PTGS2 |
| TSC22D1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,50 \times 10^{-2}$ | IL8 |
| VAV1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,50 \times 10^{-2}$ | PTGS2 |
| HHEX | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,50 \times 10^{-2}$ | FLT1 |
| AIP | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,50 \times 10^{-2}$ | CYP1A1 |
| SPIB | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,50 \times 10^{-2}$ | PRDM1 |
| PITX1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,50 \times 10^{-2}$ | FST |
| NR3C2 | | Πυρηνικός υποδοχέας εξαρτώμενος από προσδέτη | $4,67 \times 10^{-2}$ | ADAMTS1, EGR1, RAPGEF4 |
| DRAP1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,74 \times 10^{-2}$ | HIST1H1B, HIST1H2AG (includes others) |
| GLI1 | | Μεταγραφικός παράγοντας | $4,83 \times 10^{-2}$ | ASPM, JAG2, MEF2C, SESN3 |
| MYC | | Μεταγραφικός παράγοντας | $1,25 \times 10^{-1}$ | CDK1, COL4A1, FABP4, MKI67, MT1E, SQRDL |

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Benjamin, E. J.; Virani, S. S.; Callaway, C. W.; Chamberlain, A. M.; Chang, A. R.; Cheng, S.; Chiuve, S. E.; Cushman, M.; Delling, F. N.; Deo, R.; de Ferranti, S. D.; Ferguson, J. F.; Fornage, M.; Gillespie, C.; Isasi, C. R.; Jimenez, M. C.; Jordan, L. C.; Judd, S. E.; Lackland, D.; Lichtman, J. H.; Lisabeth, L.; Liu, S.; Longenecker, C. T.; Lutsey, P. L.; Mackey, J. S.; Matchar, D. B.; Matsushita, K.; Mussolino, M. E.; Nasir, K.; O'Flaherty, M.; Palaniappan, L. P.; Pandey, A.; Pandey, D. K.; Reeves, M. J.; Ritchey, M. D.; Rodriguez, C. J.; Roth, G. A.; Rosamond, W. D.; Sampson, U. K. A.; Satou, G. M.; Shah, S. H.; Spartano, N. L.; Tirschwell, D. L.; Tsao, C. W.; Voeks, J. H.; Willey, J. Z.; Wilkins, J. T.; Wu, J. H.; Alger, H. M.; Wong, S. S.; Muntner, P.; American Heart Association Council on, E.; Prevention Statistics, C.; Stroke Statistics, S., Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **2018**, 137, (12), e67-e492. doi:10.1161/CIR.0000000000000558.
2. Collaborators, G. B. D. C. o. D., Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, 392, (10159), 1736-1788. doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
3. Townsend, N.; Wilson, L.; Bhatnagar, P.; Wickramasinghe, K.; Rayner, M.; Nichols, M., Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European heart journal* **2016**, 37, (42), 3232-3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334.
4. Writing Group, M.; Mozaffarian, D.; Benjamin, E. J.; Go, A. S.; Arnett, D. K.; Blaha, M. J.; Cushman, M.; Das, S. R.; de Ferranti, S.; Despres, J. P.; Fullerton, H. J.; Howard, V. J.; Huffman, M. D.; Isasi, C. R.; Jimenez, M. C.; Judd, S. E.; Kissela, B. M.; Lichtman, J. H.; Lisabeth, L. D.; Liu, S.; Mackey, R. H.; Magid, D. J.; McGuire, D. K.; Mohler, E. R., 3rd; Moy, C. S.; Muntner, P.; Mussolino, M. E.; Nasir, K.; Neumar, R. W.; Nichol, G.; Palaniappan, L.; Pandey, D. K.; Reeves, M. J.; Rodriguez, C. J.; Rosamond, W.; Sorlie, P. D.; Stein, J.; Towfighi, A.; Turan, T. N.; Virani, S. S.; Woo, D.; Yeh, R. W.; Turner, M. B.; American Heart Association Statistics, C.; Stroke Statistics, S., Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **2016**, 133, (4), 447-54. doi:10.1161/CIR.0000000000000366.
5. Mozaffarian, D.; Benjamin, E. J.; Go, A. S.; Arnett, D. K.; Blaha, M. J.; Cushman, M.; de Ferranti, S.; Despres, J. P.; Fullerton, H. J.; Howard, V. J.; Huffman, M. D.; Judd, S. E.; Kissela, B. M.; Lackland, D. T.; Lichtman, J. H.; Lisabeth, L. D.; Liu, S.; Mackey, R. H.; Matchar, D. B.; McGuire, D. K.; Mohler, E. R., 3rd; Moy, C. S.; Muntner, P.; Mussolino, M. E.; Nasir, K.; Neumar, R. W.; Nichol, G.; Palaniappan, L.; Pandey, D. K.; Reeves, M. J.; Rodriguez, C. J.; Sorlie, P. D.; Stein, J.; Towfighi, A.; Turan, T. N.; Virani, S. S.; Willey, J. Z.; Woo, D.; Yeh, R. W.; Turner, M. B.; American Heart Association Statistics, C.; Stroke Statistics, S., Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **2015**, 131, (4), e29-322. doi:10.1161/CIR.0000000000000152.
6. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* **1999**, 340, (2), 115-26. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
7. Lusis, A. J., Atherosclerosis. *Nature* **2000**, 407, (6801), 233-41. doi:10.1038/35025203.
8. Strong, J. P.; Malcom, G. T.; McMahan, C. A.; Tracy, R. E.; Newman, W. P., 3rd; Herderick, E. E.; Cornhill, J. F., Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *Jama* **1999**, 281, (8), 727-35. doi:10.1001/jama.281.8.727.
9. Rader, D. J.; Daugherty, A., Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* **2008**, 451, (7181), 904-13. doi:10.1038/nature06796.
10. Sanz, J.; Fayad, Z. A., Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* **2008**, 451, (7181), 953-7. doi:10.1038/nature06803.
11. Huang, L.; Chambliss, K. L.; Gao, X.; Yuhanna, I. S.; Behling-Kelly, E.; Bergaya, S.; Ahmed, M.; Michaely, P.; Luby-Phelps, K.; Darehshouri, A.; Xu, L.; Fisher, E. A.; Ge, W. P.; Mineo, C.; Shaul, P. W., SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. *Nature* **2019**, 569, (7757), 565-569. doi:10.1038/s41586-019-1140-4.

12. Flood, C.; Gustafsson, M.; Pitas, R. E.; Arnaboldi, L.; Walzem, R. L.; Boren, J., Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2004**, *24*, (3), 564-70. doi:10.1161/01.ATV.0000117174.19078.85.
13. Miller, Y. I.; Shyy, J. Y., Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **2017**, *28*, (2), 143-152. doi:10.1016/j.tem.2016.11.002.
14. Gistera, A.; Hansson, G. K., The immunology of atherosclerosis. *Nature reviews. Nephrology* **2017**, *13*, (6), 368-380. doi:10.1038/nrneph.2017.51.
15. Bekkering, S.; Quintin, J.; Joosten, L. A.; van der Meer, J. W.; Netea, M. G.; Riksen, N. P., Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2014**, *34*, (8), 1731-8. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303887.
16. Van Vre, E. A.; Ait-Oufella, H.; Tedgui, A.; Mallat, Z., Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2012**, *32*, (4), 887-93. doi:10.1161/ATVBAHA.111.224873.
17. Chistiakov, D. A.; Orekhov, A. N.; Bobryshev, Y. V., Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta physiologica* **2015**, *214*, (1), 33-50. doi:10.1111/apha.12466.
18. Chistiakov, D. A.; Orekhov, A. N.; Bobryshev, Y. V., Contribution of neovascularization and intraplaque haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability. *Acta physiologica* **2015**, *213*, (3), 539-53. doi:10.1111/apha.12438.
19. Steinl, D. C.; Kaufmann, B. A., Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis. *International journal of molecular sciences* **2015**, *16*, (5), 9749-69. doi:10.3390/ijms16059749.
20. Keane, J. F., Jr., Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Molecular aspects of medicine* **2000**, *21*, (4-5), 99-166. doi:10.1016/s0098-2997(00)00005-4.
21. Xu, S.; Ilyas, I.; Little, P. J.; Li, H.; Kamato, D.; Zheng, X.; Luo, S.; Li, Z.; Liu, P.; Han, J.; Harding, I. C.; Ebong, E. E.; Cameron, S. J.; Stewart, A. G.; Weng, J., Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacological reviews* **2021**, *73*, (3), 924-967. doi:10.1124/pharmrev.120.000096.
22. Cahill, P. A.; Redmond, E. M., Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* **2016**, *248*, 97-109. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
23. Rahimi, N., Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function. *Frontiers in immunology* **2017**, *8*, 1847. doi:10.3389/fimmu.2017.01847.
24. Gimbrone, M. A., Jr.; Garcia-Cardena, G., Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research* **2016**, *118*, (4), 620-36. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
25. Vanhoutte, P. M.; Zhao, Y.; Xu, A.; Leung, S. W., Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circulation research* **2016**, *119*, (2), 375-96. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306531.
26. Kaur, R.; Kaur, M.; Singh, J., Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovascular diabetology* **2018**, *17*, (1), 121. doi:10.1186/s12933-018-0763-3.
27. Hamburg, N. M.; Keyes, M. J.; Larson, M. G.; Vasani, R. S.; Schnabel, R.; Pryde, M. M.; Mitchell, G. F.; Sheffy, J.; Vita, J. A.; Benjamin, E. J., Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **2008**, *117*, (19), 2467-74. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748574.
28. Escobar, E., Hypertension and coronary heart disease. *Journal of human hypertension* **2002**, *16* Suppl 1, S61-3. doi:10.1038/sj.jhh.1001345.
29. Chen, P. Y.; Qin, L.; Baeyens, N.; Li, G.; Afolabi, T.; Budatha, M.; Tellides, G.; Schwartz, M. A.; Simons, M., Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *The Journal of clinical investigation* **2015**, *125*, (12), 4514-28. doi:10.1172/JCI82719.

30. Steyers, C. M., 3rd; Miller, F. J., Jr., Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *International journal of molecular sciences* **2014**, 15, (7), 11324-49. doi:10.3390/ijms150711324.
31. Cardona, A.; Kondapally Seshasai, S. R.; Davey, J.; Arrebola-Moreno, A. L.; Ambrosio, G.; Kaski, J. C.; Ray, K. K., A meta-analysis of published studies of endothelial dysfunction does not support its routine clinical use. *International journal of clinical practice* **2015**, 69, (6), 649-58. doi:10.1111/ijcp.12630.
32. Butt, M.; Dwivedi, G.; Blann, A.; Khair, O.; Lip, G. Y., Endothelial dysfunction: methods of assessment & implications for cardiovascular diseases. *Current pharmaceutical design* **2010**, 16, (31), 3442-54. doi:10.2174/138161210793563383.
33. Gradinaru, D.; Borsa, C.; Ionescu, C.; Prada, G. I., Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of ageing and development* **2015**, 151, 101-13. doi:10.1016/j.mad.2015.03.003.
34. Stylianou, I. M.; Bauer, R. C.; Reilly, M. P.; Rader, D. J., Genetic basis of atherosclerosis: insights from mice and humans. *Circulation research* **2012**, 110, (2), 337-55. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.230854.
35. Malakar, A. K.; Choudhury, D.; Halder, B.; Paul, P.; Uddin, A.; Chakraborty, S., A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *Journal of cellular physiology* **2019**, 234, (10), 16812-16823. doi:10.1002/jcp.28350.
36. Arsenaault, B. J.; Boekholdt, S. M.; Kastelein, J. J., Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. *Nature reviews. Cardiology* **2011**, 8, (4), 197-206. doi:10.1038/nrcardio.2010.223.
37. Ng, D. S.; Wong, N. C.; Hegele, R. A., HDL--is it too big to fail? *Nature reviews. Endocrinology* **2013**, 9, (5), 308-12. doi:10.1038/nrendo.2012.238.
38. Nordestgaard, B. G., Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circulation research* **2016**, 118, (4), 547-63. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306249.
39. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2004**, 24, (11), 2181-7. doi:10.1161/01.ATV.0000146325.93749.a8.
40. Michos, E. D.; McEvoy, J. W.; Blumenthal, R. S., Lipid Management for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *The New England journal of medicine* **2019**, 381, (16), 1557-1567. doi:10.1056/NEJMra1806939.
41. Adhyaru, B. B.; Jacobson, T. A., Safety and efficacy of statin therapy. *Nature reviews. Cardiology* **2018**, 15, (12), 757-769. doi:10.1038/s41569-018-0098-5.
42. Baigent, C.; Keech, A.; Kearney, P. M.; Blackwell, L.; Buck, G.; Pollicino, C.; Kirby, A.; Sourjina, T.; Peto, R.; Collins, R.; Simes, R.; Cholesterol Treatment Trialists, C., Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* **2005**, 366, (9493), 1267-78. doi:10.1016/S0140-6736(05)67394-1.
43. Sampson, U. K.; Fazio, S.; Linton, M. F., Residual cardiovascular risk despite optimal LDL cholesterol reduction with statins: the evidence, etiology, and therapeutic challenges. *Current atherosclerosis reports* **2012**, 14, (1), 1-10. doi:10.1007/s11883-011-0219-7.
44. Perrone, V.; Sangiorgi, D.; Buda, S.; Degli Esposti, L., Residual cardiovascular risk in patients who received lipid-lowering treatment in a real-life setting: retrospective study. *ClinicoEconomics and outcomes research : CEOR* **2016**, 8, 649-655. doi:10.2147/CEOR.S107992.
45. Bucher, H. C.; Griffith, L. E.; Guyatt, G. H., Systematic review on the risk and benefit of different cholesterol-lowering interventions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1999**, 19, (2), 187-95. doi:10.1161/01.atv.19.2.187.
46. Cholesterol Treatment Trialists, C.; Baigent, C.; Blackwell, L.; Emberson, J.; Holland, L. E.; Reith, C.; Bhalra, N.; Peto, R.; Barnes, E. H.; Keech, A.; Simes, J.; Collins, R., Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* **2010**, 376, (9753), 1670-81. doi:10.1016/S0140-6736(10)61350-5.

47. Karalis, D. G.; Victor, B.; Ahedor, L.; Liu, L., Use of Lipid-Lowering Medications and the Likelihood of Achieving Optimal LDL-Cholesterol Goals in Coronary Artery Disease Patients. *Cholesterol* **2012**, 2012, 861924. doi:10.1155/2012/861924.
48. van Capelleveen, J. C.; Brewer, H. B.; Kastelein, J. J.; Hovingh, G. K., Novel therapies focused on the high-density lipoprotein particle. *Circulation research* **2014**, 114, (1), 193-204. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301804.
49. 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, (1), 8-15. doi:10.1161/01.cir.79.1.8.
50. Luscher, T. F.; Landmesser, U.; von Eckardstein, A.; Fogelman, A. M., High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circulation research* **2014**, 114, (1), 171-82. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300935.
51. Sposito, A. C.; Carmo, H. R.; Barreto, J.; Sun, L.; Carvalho, L. S. F.; Feinstein, S. B.; Zanotti, I.; Kontush, A.; Remaley, A., HDL-Targeted Therapies During Myocardial Infarction. *Cardiovascular drugs and therapy* **2019**, 33, (3), 371-381. doi:10.1007/s10557-019-06865-1.
52. Zannis, V. I.; Kardassis, D.; Zanni, E. E., Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Advances in human genetics* **1993**, 21, 145-319. doi:10.1007/978-1-4615-3010-7_3.
53. Vassilis I Zannis, K. E. K., Angeliki Chroni, Dimitris Kardassis, Eleni E Zanni, Lipoproteins and atherogenesis. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, Loscalzo, J., Ed. Taylor & Francis, New York, NY: 2004/11/30; Vol. 8, pp 111-174.
54. Estrada-Luna, D.; Ortiz-Rodriguez, M. A.; Medina-Briseno, L.; Carreon-Torres, E.; Izquierdo-Vega, J. A.; Sharma, A.; Cancino-Diaz, J. C.; Perez-Mendez, O.; Belefant-Miller, H.; Betanzos-Cabrera, G., Current Therapies Focused on High-Density Lipoproteins Associated with Cardiovascular Disease. *Molecules* **2018**, 23, (11), doi:10.3390/molecules23112730.
55. Vassilis Zannis, A. K., Panagiotis Fotakis, Eleni Zanni and Dimitris Kardassis, Pleiotropic Functions of HDL Lead to Protection from Atherosclerosis and Other Diseases. In *Dyslipidemia - From Prevention to Treatment*, Kelishadi, R., Ed. IntechOpen: 2012/02/03; Vol. 9, pp 173-198.
56. Zannis, V. I.; Fotakis, P.; Koukos, G.; Kardassis, D.; Ehnholm, C.; Jauhiainen, M.; Chroni, A., HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handbook of experimental pharmacology* **2015**, 224, 53-111. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_2.
57. Zannis, V. I.; Chroni, A.; Krieger, M., Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *Journal of molecular medicine* **2006**, 84, (4), 276-94. doi:10.1007/s00109-005-0030-4.
58. Wang, N.; Lan, D.; Chen, W.; Matsuura, F.; Tall, A. R., ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, (26), 9774-9. doi:10.1073/pnas.0403506101.
59. Lusa, S.; Jauhiainen, M.; Metso, J.; Somerharju, P.; Ehnholm, C., The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *The Biochemical journal* **1996**, 313 (Pt 1), 275-82. doi:10.1042/bj3130275.
60. 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, (5248), 518-20. doi:10.1126/science.271.5248.518.
61. 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, 153-161. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.034.
62. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2003**, 23, (2), 160-7. doi:10.1161/01.atv.0000054658.91146.64.
63. Tani, M.; Horvath, K. V.; Lamarche, B.; Couture, P.; Burnett, J. R.; Schaefer, E. J.; Asztalos, B. F., High-density lipoprotein subpopulation profiles in lipoprotein lipase and hepatic lipase deficiency. *Atherosclerosis* **2016**, 253, 7-14. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.014.

64. Ishida, T.; Choi, S.; Kundu, R. K.; Hirata, K.; Rubin, E. M.; Cooper, A. D.; Quertermous, T., Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *The Journal of clinical investigation* **2003**, *111*, (3), 347-55. doi:10.1172/JCI16306.
65. Martinez, L. O.; Najib, S.; Perret, B.; Cabou, C.; Lichtenstein, L., Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins. *Atherosclerosis* **2015**, *238*, (1), 89-100. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.017.
66. Kozyraki, R.; Fyfe, J.; Kristiansen, M.; Gerdes, C.; Jacobsen, C.; Cui, S.; Christensen, E. I.; Aminoff, M.; de la Chapelle, A.; Krahe, R.; Verroust, P. J.; Moestrup, S. K., The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nature medicine* **1999**, *5*, (6), 656-61. doi:10.1038/9504.
67. Chroni, A.; Kardassis, D., HDL Dysfunction Caused by Mutations in apoA-I and Other Genes that are Critical for HDL Biogenesis and Remodeling. *Current medicinal chemistry* **2019**, *26*, (9), 1544-1575. doi:10.2174/0929867325666180313114950.
68. Kontush, A.; Lindahl, M.; Lhomme, M.; Calabresi, L.; Chapman, M. J.; Davidson, W. S., Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handbook of experimental pharmacology* **2015**, *224*, 3-51. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_1.
69. Silva, R.; Schneeweis, L. A.; Krishnan, S. C.; Zhang, X.; Axelsen, P. H.; Davidson, W. S., The structure of apolipoprotein A-II in discoidal high density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282*, (13), 9713-9721. doi:10.1074/jbc.M610380200.
70. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, (34), 12176-81. doi:10.1073/pnas.0803626105.
71. Segrest, J. P.; Li, L.; Anantharamaiah, G. M.; Harvey, S. C.; Liadaki, K. N.; Zannis, V., Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Current opinion in lipidology* **2000**, *11*, (2), 105-15. doi:10.1097/00041433-200004000-00002.
72. Mehta, A.; Shapiro, M. D., Apolipoproteins in vascular biology and atherosclerotic disease. *Nature reviews. Cardiology* **2022**, *19*, (3), 168-179. doi:10.1038/s41569-021-00613-5.
73. Michell, D. L.; Vickers, K. C., Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochimica et biophysica acta* **2016**, *1861*, (12 Pt B), 2069-2074. doi:10.1016/j.bbali.2016.01.011.
74. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2005**, *25*, (10), 2185-91. doi:10.1161/01.ATV.0000183727.90611.4f.
75. 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. *The Journal of clinical investigation* **2007**, *117*, (3), 746-56. doi:10.1172/JCI26206.
76. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2009**, *29*, (6), 870-6. doi:10.1161/ATVBAHA.109.186031.
77. Shah, A. S.; Tan, L.; Long, J. L.; Davidson, W. S., Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *Journal of lipid research* **2013**, *54*, (10), 2575-85. doi:10.1194/jlr.R035725.
78. Wiesner, P.; Leidl, K.; Boettcher, A.; Schmitz, G.; Liebisch, G., Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of lipid research* **2009**, *50*, (3), 574-585. doi:10.1194/jlr.D800028-JLR200.
79. Camont, L.; Lhomme, M.; Rached, F.; Le Goff, 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2013**, *33*, (12), 2715-23. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301468.

80. Kontush, A.; Lhomme, M.; Chapman, M. J., Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *Journal of lipid research* **2013**, 54, (11), 2950-63. doi:10.1194/jlr.R036095.
81. Alwaili, K.; Bailey, D.; Awan, Z.; Bailey, S. D.; Ruel, I.; Hafiane, A.; Krimbou, L.; Laboissiere, S.; Genest, J., The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, 1821, (3), 405-15. doi:10.1016/j.bbali.2011.07.013.
82. Annema, W.; von Eckardstein, A., High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **2013**, 77, (10), 2432-48. doi:10.1253/circj.cj-13-1025.
83. Hyotylainen, T.; Mattila, I.; Wiedmer, S. K.; Koivuniemi, A.; Taskinen, M. R.; Yki-Jarvinen, H.; Oresic, M., Metabolomic analysis of polar metabolites in lipoprotein fractions identifies lipoprotein-specific metabolic profiles and their association with insulin resistance. *Molecular bioSystems* **2012**, 8, (10), 2559-65. doi:10.1039/c2mb25115a.
84. 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. *Nature cell biology* **2011**, 13, (4), 423-33. doi:10.1038/ncb2210.
85. Hafiane, A.; Genest, J., High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA clinical* **2015**, 3, 175-88. doi:10.1016/j.bbali.2015.01.005.
86. Kulkarni, K. R.; Marcovina, S. M.; Krauss, R. M.; Garber, D. W.; Glasscock, A. M.; Segrest, J. P., Quantification of HDL2 and HDL3 cholesterol by the Vertical Auto Profile-II (VAP-II) methodology. *Journal of lipid research* **1997**, 38, (11), 2353-64.
87. Blanche, P. J.; Gong, E. L.; Forte, T. M.; Nichols, A. V., Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochimica et biophysica acta* **1981**, 665, (3), 408-19. doi:10.1016/0005-2760(81)90253-8.
88. 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. *Clinical chemistry* **2011**, 57, (3), 392-410. doi:10.1373/clinchem.2010.155333.
89. Cheung, M. C.; 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. *The Journal of biological chemistry* **1984**, 259, (19), 12201-9.
90. Castro, G. R.; Fielding, C. J., Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* **1988**, 27, (1), 25-9. doi:10.1021/bi00401a005.
91. Huang, Y.; von Eckardstein, A.; Wu, S.; Maeda, N.; Assmann, G., A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, (5), 1834-8. doi:10.1073/pnas.91.5.1834.
92. Freeman, L. A., Native-native 2D gel electrophoresis for HDL subpopulation analysis. *Methods in molecular biology* **2013**, 1027, 353-67. doi:10.1007/978-1-60327-369-5_17.
93. Camont, L.; Chapman, M. J.; Kontush, A., Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in molecular medicine* **2011**, 17, (10), 594-603. doi:10.1016/j.molmed.2011.05.013.
94. Zannis, V. I.; Kurnit, D. M.; Breslow, J. L., Hepatic apo-A-I and apo-E and intestinal apo-A-I are synthesized in precursor isoprotein forms by organ cultures of human fetal tissues. *The Journal of biological chemistry* **1982**, 257, (1), 536-44.
95. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1983**, 80, (9), 2574-8. doi:10.1073/pnas.80.9.2574.
96. Zannis, V. I.; Kan, H. Y.; Kritis, A.; Zanni, E. E.; Kardassis, D., Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. *Current opinion in lipidology* **2001**, 12, (2), 181-207. doi:10.1097/00041433-200104000-00012.
97. Mei, X.; Atkinson, D., Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development. *Archives of medical research* **2015**, 46, (5), 351-60. doi:10.1016/j.arcmed.2015.05.012.

98. Davidson, W. S.; Hazlett, T.; Mantulin, W. W.; Jonas, A., The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93, (24), 13605-10. doi:10.1073/pnas.93.24.13605.
99. 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. *Journal of lipid research* **2013**, 54, (12), 3293-302. doi:10.1194/jlr.M043489.
100. 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. *Journal of lipid research* **2013**, 54, (12), 3281-92. doi:10.1194/jlr.M038356.
101. Chroni, A.; Liu, T.; Gorshkova, I.; Kan, H. Y.; Uehara, Y.; Von Eckardstein, A.; Zannis, V. I., The central helices of ApoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type ApoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, (9), 6719-30. doi:10.1074/jbc.M205232200.
102. Tiniakou, I.; Kanaki, Z.; Georgopoulos, S.; Chroni, A.; Van Eck, 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, (1), 77-85. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.028.
103. Riwanto, M.; Landmesser, U., High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease. *Journal of lipid research* **2013**, 54, (12), 3227-43. doi:10.1194/jlr.R037762.
104. Marais, A. D., Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* **2019**, 51, (2), 165-176. doi:10.1016/j.pathol.2018.11.002.
105. Marais, A. D., Apolipoprotein E and Atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* **2021**, 23, (7), 34. doi:10.1007/s11883-021-00933-4.
106. Elshourbagy, N. A.; Liao, W. S.; Mahley, R. W.; Taylor, J. M., Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, 82, (1), 203-7. doi:10.1073/pnas.82.1.203.
107. Newman, T. C.; Dawson, P. A.; Rudel, L. L.; Williams, D. L., Quantitation of apolipoprotein E mRNA in the liver and peripheral tissues of nonhuman primates. *The Journal of biological chemistry* **1985**, 260, (4), 2452-7.
108. Greenow, K.; Pearce, N. J.; Ramji, D. P., The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *Journal of molecular medicine* **2005**, 83, (5), 329-42. doi:10.1007/s00109-004-0631-3.
109. Vedhachalam, C.; Narayanaswami, V.; Neto, N.; Forte, T. M.; Phillips, M. C.; Lund-Katz, S.; Bielicki, J. K., The C-terminal lipid-binding domain of apolipoprotein E is a highly efficient mediator of ABCA1-dependent cholesterol efflux that promotes the assembly of high-density lipoproteins. *Biochemistry* **2007**, 46, (10), 2583-93. doi:10.1021/bi602407r.
110. Krimbou, L.; Denis, M.; Haidar, B.; Carrier, M.; Marcil, M.; Genest, J., Jr., Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *Journal of lipid research* **2004**, 45, (5), 839-48. doi:10.1194/jlr.M300418-JLR200.
111. Kypreos, K. E.; Zannis, V. I., Pathway of biogenesis of apolipoprotein E-containing HDL in vivo with the participation of ABCA1 and LCAT. *The Biochemical journal* **2007**, 403, (2), 359-67. doi:10.1042/BJ20061048.
112. 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. *The Journal of clinical investigation* **2006**, 116, (5), 1435-42. doi:10.1172/JCI27602.
113. Mahley, R. W.; Huang, Y.; Weisgraber, K. H., Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *The Journal of clinical investigation* **2006**, 116, (5), 1226-9. doi:10.1172/JCI28632.
114. 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, (39), 13132-43. doi:10.1021/bi051029o.

115. Allan, C. M.; Walker, D.; Segrest, J. P.; Taylor, J. M., Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. *Genomics* **1995**, *28*, (2), 291-300. doi:10.1006/geno.1995.1144.
116. Wilson, C.; Wardell, M. R.; Weisgraber, K. H.; Mahley, R. W.; Agard, D. A., Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* **1991**, *252*, (5014), 1817-22. doi:10.1126/science.2063194.
117. Weisgraber, K. H., Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Advances in protein chemistry* **1994**, *45*, 249-302. doi:10.1016/s0065-3233(08)60642-7.
118. Libeu, C. P.; Lund-Katz, S.; Phillips, M. C.; Wehrli, S.; Hernaiz, M. J.; Capila, I.; Linhardt, R. J.; Raffai, R. L.; Newhouse, Y. M.; Zhou, F.; Weisgraber, K. H., New insights into the heparan sulfate proteoglycan-binding activity of apolipoprotein E. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, (42), 39138-44. doi:10.1074/jbc.M104746200.
119. Li, X.; Kan, H. Y.; Lavrentiadou, S.; Krieger, M.; Zannis, V., Reconstituted discoidal ApoE-phospholipid particles are ligands for the scavenger receptor BI. The amino-terminal 1-165 domain of ApoE suffices for receptor binding. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, (24), 21149-57. doi:10.1074/jbc.M200658200.
120. Mahley, R. W., Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of molecular medicine* **2016**, *94*, (7), 739-46. doi:10.1007/s00109-016-1427-y.
121. Hatters, D. M.; Peters-Libeu, C. A.; Weisgraber, K. H., Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in biochemical sciences* **2006**, *31*, (8), 445-54. doi:10.1016/j.tibs.2006.06.008.
122. Chen, Y.; Strickland, M. R.; Soranno, A.; Holtzman, D. M., Apolipoprotein E: Structural Insights and Links to Alzheimer Disease Pathogenesis. *Neuron* **2021**, *109*, (2), 205-221. doi:10.1016/j.neuron.2020.10.008.
123. Kypreos, K. E., ABCA1 promotes the de novo biogenesis of apolipoprotein CIII-containing HDL particles in vivo and modulates the severity of apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia. *Biochemistry* **2008**, *47*, (39), 10491-502. doi:10.1021/bi801249c.
124. Duka, A.; Fotakis, P.; Georgiadou, D.; Kateifides, A.; Tzavlaki, K.; von Eckardstein, L.; Stratikos, E.; Kardassis, D.; Zannis, V. I., ApoA-IV promotes the biogenesis of apoA-IV-containing HDL particles with the participation of ABCA1 and LCAT. *Journal of lipid research* **2013**, *54*, (1), 107-15. doi:10.1194/jlr.M030114.
125. Filou, S.; Lhomme, M.; Karavia, E. A.; Kalogeropoulou, C.; Theodoropoulos, V.; Zvintzou, E.; Sakellaropoulos, G. C.; Petropoulou, P. I.; Constantinou, C.; Kontush, A.; Kypreos, K. E., Distinct Roles of Apolipoproteins A1 and E in the Modulation of High-Density Lipoprotein Composition and Function. *Biochemistry* **2016**, *55*, (27), 3752-62. doi:10.1021/acs.biochem.6b00389.
126. Zhu, Y.; Bellosta, S.; Langer, C.; Bernini, F.; Pitas, R. E.; Mahley, R. W.; Assmann, G.; von Eckardstein, A., Low-dose expression of a human apolipoprotein E transgene in macrophages restores cholesterol efflux capacity of apolipoprotein E-deficient mouse plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, (13), 7585-90. doi:10.1073/pnas.95.13.7585.
127. Bellosta, S.; Mahley, R. W.; Sanan, D. A.; Murata, J.; Newland, D. L.; Taylor, J. M.; Pitas, R. E., Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *The Journal of clinical investigation* **1995**, *96*, (5), 2170-9. doi:10.1172/JCI118271.
128. Li, X.; Kypreos, K.; Zanni, E. E.; Zannis, V., Domains of apoE required for binding to apoE receptor 2 and to phospholipids: implications for the functions of apoE in the brain. *Biochemistry* **2003**, *42*, (35), 10406-17. doi:10.1021/bi027093c.
129. 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. *Annals of medicine* **2008**, *40* Suppl 1, 14-28. doi:10.1080/07853890701687219.
130. Taylor, A. J.; Sullenberger, L. E.; Lee, H. J.; Lee, J. K.; Grace, K. A., Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in

- secondary prevention patients treated with statins. *Circulation* **2004**, 110, (23), 3512-7. doi:10.1161/01.CIR.0000148955.19792.8D.
131. Chapman, M. J.; Assmann, G.; Fruchart, J. C.; Shepherd, J.; Sirtori, C.; European Consensus Panel on, H.-C., Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Current medical research and opinion* **2004**, 20, (8), 1253-68. doi:10.1185/030079904125004402.
 132. Tangirala, R. K.; Tsukamoto, K.; Chun, S. H.; Usher, D.; Pure, E.; Rader, D. J., Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* **1999**, 100, (17), 1816-22. doi:10.1161/01.cir.100.17.1816.
 133. Tardy, C.; Goffinet, M.; Boubekour, N.; Cholez, G.; Ackermann, R.; Sy, G.; Keyserling, C.; Lalwani, N.; Paolini, J. F.; Dasseux, J. L.; Barbaras, R.; Baron, R., HDL and CER-001 Inverse-Dose Dependent Inhibition of Atherosclerotic Plaque Formation in apoE^{-/-} Mice: Evidence of ABCA1 Down-Regulation. *PloS one* **2015**, 10, (9), e0137584. doi:10.1371/journal.pone.0137584.
 134. 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, (1), 72-7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.006.
 135. Nicholls, S. J.; Cutri, B.; Worthley, S. G.; Kee, P.; Rye, K. A.; Bao, S.; Barter, P. J., Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2005**, 25, (11), 2416-21. doi:10.1161/01.ATV.0000184760.95957.d6.
 136. Ardans, J. A.; Economou, A. P.; Martinson, J. M., Jr.; Zhou, M.; Wahl, L. M., Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and -9 by activated monocytes. *Journal of leukocyte biology* **2002**, 71, (6), 1012-8.
 137. Wang, X.; Collins, H. L.; Ranalletta, M.; Fuki, I. V.; Billheimer, J. T.; Rothblat, G. H.; Tall, A. R.; Rader, D. J., Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *The Journal of clinical investigation* **2007**, 117, (8), 2216-24. doi:10.1172/JCI32057.
 138. Miyazaki, A.; Rahim, A. T.; Ohta, T.; Morino, Y.; Horiuchi, S., High density lipoprotein mediates selective reduction in cholesteryl esters from macrophage foam cells. *Biochimica et biophysica acta* **1992**, 1126, (1), 73-80. doi:10.1016/0005-2760(92)90219-l.
 139. Woudberg, N. J.; Pedretti, S.; Lecour, S.; Schulz, R.; Vuilleumier, N.; James, R. W.; Frias, M. A., Pharmacological Intervention to Modulate HDL: What Do We Target? *Frontiers in pharmacology* **2017**, 8, 989. doi:10.3389/fphar.2017.00989.
 140. Badimon, L.; Vilahur, G., LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2012**, 1254, 18-32. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06480.x.
 141. Bhatt, A.; Rohatgi, A., HDL Cholesterol Efflux Capacity: Cardiovascular Risk Factor and Potential Therapeutic Target. *Current atherosclerosis reports* **2016**, 18, (1), 2. doi:10.1007/s11883-015-0554-1.
 142. 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, (15), 1905-19. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589.
 143. Remaley, A. T.; Norata, G. D.; Catapano, A. L., Novel concepts in HDL pharmacology. *Cardiovascular research* **2014**, 103, (3), 423-8. doi:10.1093/cvr/cvu141.
 144. Bortnick, A. E.; Rothblat, G. H.; Stoudt, G.; Hoppe, K. L.; Royer, L. J.; McNeish, J.; Francone, O. L., The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *The Journal of biological chemistry* **2000**, 275, (37), 28634-40. doi:10.1074/jbc.M003407200.
 145. Yvan-Charvet, L.; Ranalletta, M.; Wang, N.; Han, S.; Terasaka, N.; Li, R.; Welch, C.; Tall, A. R., Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **2007**, 117, (12), 3900-8. doi:10.1172/JCI33372.

146. Phillips, M. C., Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *The Journal of biological chemistry* **2014**, 289, (35), 24020-9. doi:10.1074/jbc.R114.583658.
147. 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 Eck, 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. *Circulation research* **2010**, 107, (12), e20-31. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226282.
148. Landmesser, U.; Hornig, B.; Drexler, H., Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* **2004**, 109, (21 Suppl 1), II27-33. doi:10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f.
149. 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. *Nature medicine* **2001**, 7, (7), 853-7. doi:10.1038/89986.
150. 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. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, (11), 9142-9. doi:10.1074/jbc.M211394200.
151. Kimura, T.; Tomura, H.; Sato, K.; Ito, M.; Matsuoka, I.; Im, D. S.; Kuwabara, A.; Mogi, C.; Itoh, H.; Kurose, H.; Murakami, M.; Okajima, F., Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **2010**, 285, (7), 4387-97. doi:10.1074/jbc.M109.043869.
152. Drew, B. G.; Fidge, N. H.; Gallon-Beaumier, G.; Kemp, B. E.; Kingwell, B. A., High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, (18), 6999-7004. doi:10.1073/pnas.0306266101.
153. 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. *The Journal of biological chemistry* **2002**, 277, (13), 11058-63. doi:10.1074/jbc.M110985200.
154. Uittenbogaard, A.; Shaul, P. W.; Yuhanna, I. S.; Blair, A.; Smart, E. J., High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *The Journal of biological chemistry* **2000**, 275, (15), 11278-83. doi:10.1074/jbc.275.15.11278.
155. Ramet, M. E.; Ramet, M.; Lu, Q.; Nickerson, M.; Savolainen, M. J.; Malzone, A.; Karas, R. H., High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *Journal of the American College of Cardiology* **2003**, 41, (12), 2288-97. doi:10.1016/s0735-1097(03)00481-9.
156. Levkau, B.; Hermann, S.; Theilmeyer, G.; van der Giet, M.; Chun, J.; Schober, O.; Schafers, M., High-density lipoprotein stimulates myocardial perfusion in vivo. *Circulation* **2004**, 110, (21), 3355-9. doi:10.1161/01.CIR.0000147827.43912.AE.
157. Spieker, L. E.; Sudano, I.; Hurlimann, D.; Lerch, P. G.; Lang, M. G.; Binggeli, C.; Corti, R.; Ruschitzka, F.; Luscher, T. F.; Noll, G., High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* **2002**, 105, (12), 1399-402. doi:10.1161/01.cir.0000013424.28206.8f.
158. Bisoendial, R. J.; Hovingh, G. K.; Levels, J. H.; Lerch, P. G.; Andresen, I.; Hayden, M. R.; Kastelein, J. J.; Stroes, E. S., Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation* **2003**, 107, (23), 2944-8. doi:10.1161/01.CIR.0000070934.69310.1A.
159. Gonzalez, E.; Kou, R.; Michel, T., Rac1 modulates sphingosine 1-phosphate-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **2006**, 281, (6), 3210-6. doi:10.1074/jbc.M510434200.
160. Nofer, J. R.; van der Giet, M.; Tolle, M.; Wolinska, I.; von Wnuck Lipinski, 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. *The Journal of clinical investigation* **2004**, 113, (4), 569-81. doi:10.1172/JCI18004.

161. Del Gaudio, I.; Sreckovic, I.; Zardoya-Laguardia, P.; Bernhart, E.; Christoffersen, C.; Frank, S.; Marsche, G.; Illanes, S. E.; Wadsack, C., Circulating cord blood HDL-S1P complex preserves the integrity of the fetoplacental vasculature. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* **2020**, 1865, (4), 158632. doi:10.1016/j.bbalip.2020.158632.
162. Terasaka, N.; Yu, S.; Yvan-Charvet, L.; Wang, N.; Mzhavia, N.; Langlois, R.; Pagler, T.; Li, R.; Welch, C. L.; Goldberg, I. J.; Tall, A. R., ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *The Journal of clinical investigation* **2008**, 118, (11), 3701-13. doi:10.1172/JCI35470.
163. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2010**, 30, (11), 2219-25. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213215.
164. 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. *The Journal of clinical investigation* **2011**, 121, (7), 2693-708. doi:10.1172/JCI42946.
165. Kratzer, A.; Giral, H.; Landmesser, U., High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular research* **2014**, 103, (3), 350-61. doi:10.1093/cvr/cvu139.
166. Cockerill, G. W.; Rye, K. A.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A.; Barter, P. J., High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1995**, 15, (11), 1987-94. doi:10.1161/01.atv.15.11.1987.
167. Calabresi, L.; Franceschini, G.; Sirtori, C. R.; De Palma, A.; Saresella, M.; Ferrante, P.; Taramelli, D., Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochemical and biophysical research communications* **1997**, 238, (1), 61-5. doi:10.1006/bbrc.1997.7236.
168. Tabet, F.; Remaley, A. T.; Segaliny, A. I.; Millet, J.; Yan, L.; Nakhla, S.; Barter, P. J.; Rye, K. A.; Lambert, G., The 5A apolipoprotein A-I mimetic peptide displays antiinflammatory and antioxidant properties in vivo and in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2010**, 30, (2), 246-52. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200196.
169. Denk, A.; Goebeler, M.; Schmid, S.; Berberich, I.; Ritz, O.; Lindemann, D.; Ludwig, S.; Wirth, T., Activation of NF-kappa B via the I kappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **2001**, 276, (30), 28451-8. doi:10.1074/jbc.M102698200.
170. 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. *The Journal of biological chemistry* **2006**, 281, (49), 37457-67. doi:10.1074/jbc.M605823200.
171. 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. *Circulation research* **2013**, 112, (2), 278-88. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300104.
172. McGrath, K. C.; Li, X. H.; Puranik, R.; Liong, 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2009**, 29, (6), 877-82. doi:10.1161/ATVBAHA.109.184663.
173. Van Linthout, S.; Spillmann, F.; Graiani, G.; Miteva, K.; Peng, J.; Van Craeyveld, E.; Meloni, M.; Tolle, M.; Escher, F.; Subasingh, A.; Doehner, W.; Quaini, F.; De Geest, B.; Schultheiss, H. P.; Tschope, C., Down-regulation of endothelial TLR4 signalling after apo A-I gene transfer contributes to improved survival in an experimental model of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Journal of molecular medicine* **2011**, 89, (2), 151-60. doi:10.1007/s00109-010-0690-6.

174. Cheng, A. M.; Handa, P.; Tateya, S.; Schwartz, J.; Tang, C.; Mitra, P.; Oram, J. F.; Chait, A.; Kim, F., Apolipoprotein A-I attenuates palmitate-mediated NF-kappaB activation by reducing Toll-like receptor-4 recruitment into lipid rafts. *PLoS one* **2012**, *7*, (3), e33917. doi:10.1371/journal.pone.0033917.
175. Mackness, B.; Hine, D.; Liu, Y.; Mastorikou, M.; Mackness, M., Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2004**, *318*, (3), 680-3. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.056.
176. Maier, J. A.; Barenghi, L.; Pagani, F.; Bradamante, S.; Comi, P.; Ragnotti, G., The protective role of high-density lipoprotein on oxidized-low-density-lipoprotein-induced U937/endothelial cell interactions. *European journal of biochemistry* **1994**, *221*, (1), 35-41. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18712.x.
177. Bursill, C. A.; Castro, M. L.; Beattie, D. T.; Nakhla, S.; van der Vorst, E.; Heather, A. K.; Barter, P. J.; Rye, K. A., High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2010**, *30*, (9), 1773-8. doi:10.1161/ATVBAHA.110.211342.
178. Galvani, S.; Sanson, M.; Blaho, V. A.; Swendeman, S. L.; Obinata, H.; Conger, H.; Dahlback, B.; Kono, M.; Proia, R. L.; Smith, J. D.; Hla, T., HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Science signaling* **2015**, *8*, (389), ra79. doi:10.1126/scisignal.aaa2581.
179. Nofer, J. R.; Geigenmuller, S.; Gopfert, C.; Assmann, G.; Buddecke, E.; Schmidt, A., High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2003**, *310*, (1), 98-103. doi:10.1016/j.bbrc.2003.08.126.
180. Norata, G. D.; Callegari, E.; Marchesi, M.; Chiesa, G.; Eriksson, P.; Catapano, A. L., High-density lipoproteins induce transforming growth factor-beta2 expression in endothelial cells. *Circulation* **2005**, *111*, (21), 2805-11. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.472886.
181. Baker, P. W.; Rye, K. A.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A.; Barter, P. J., Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of lipid research* **2000**, *41*, (8), 1261-7.
182. Murphy, A. J.; Woollard, K. J.; Hoang, A.; Mukhamedova, N.; Stirzaker, R. A.; McCormick, S. P.; Remaley, A. T.; Sviridov, D.; Chin-Dusting, J., High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2008**, *28*, (11), 2071-7. doi:10.1161/ATVBAHA.108.168690.
183. Okura, H.; Yamashita, S.; Ohama, T.; Saga, A.; Yamamoto-Kakuta, A.; Hamada, Y.; Sougawa, N.; Ohyama, R.; Sawa, Y.; Matsuyama, A., HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **2010**, *17*, (6), 568-77. doi:10.5551/jat.3921.
184. Tolle, M.; Pawlak, A.; Schuchardt, M.; Kawamura, A.; Tietge, U. J.; Lorkowski, S.; Keul, P.; Assmann, G.; Chun, J.; Levkau, B.; van der Giet, M.; Nofer, J. R., HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2008**, *28*, (8), 1542-8. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161042.
185. Keul, P.; Polzin, A.; Kaiser, K.; Graler, M.; Dannenberg, L.; Daum, G.; Heusch, G.; Levkau, B., Potent anti-inflammatory properties of HDL in vascular smooth muscle cells mediated by HDL-S1P and their impairment in coronary artery disease due to lower HDL-S1P: a new aspect of HDL dysfunction and its therapy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2019**, *33*, (1), 1482-1495. doi:10.1096/fj.201801245R.
186. Nicholls, S. J.; Dusting, G. J.; Cutri, B.; Bao, S.; Drummond, G. R.; Rye, K. A.; Barter, P. J., Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* **2005**, *111*, (12), 1543-50. doi:10.1161/01.CIR.0000159351.95399.50.
187. Dimayuga, P.; Zhu, J.; Oguchi, S.; Chyu, K. Y.; Xu, X. O.; Yano, J.; Shah, P. K.; Nilsson, J.; Cercek, B., Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periaortic cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochemical and biophysical research communications* **1999**, *264*, (2), 465-8. doi:10.1006/bbrc.1999.1278.

188. Patel, S.; Drew, B. G.; Nakhla, S.; Duffy, S. J.; Murphy, A. J.; Barter, P. J.; Rye, K. A.; Chin-Dusting, J.; Hoang, A.; Sviridov, D.; Celermajer, D. S.; Kingwell, B. A., Reconstituted high-density lipoprotein increases plasma high-density lipoprotein anti-inflammatory properties and cholesterol efflux capacity in patients with type 2 diabetes. *Journal of the American College of Cardiology* **2009**, *53*, (11), 962-71. doi:10.1016/j.jacc.2008.12.008.
189. Rossig, L.; Dimmeler, S.; Zeiher, A. M., Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic research in cardiology* **2001**, *96*, (1), 11-22. doi:10.1007/s003950170073.
190. Burke, A. P.; Farb, A.; Malcom, G. T.; Liang, Y. H.; Smialek, J.; Virmani, R., Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *The New England journal of medicine* **1997**, *336*, (18), 1276-82. doi:10.1056/NEJM199705013361802.
191. Sugano, M.; Tsuchida, K.; Makino, N., High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* **2000**, *272*, (3), 872-6. doi:10.1006/bbrc.2000.2877.
192. 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. *Journal of cellular and molecular medicine* **2010**, *14*, (3), 608-20. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00713.x.
193. Noor, R.; Shuaib, U.; Wang, C. X.; Todd, K.; Ghani, U.; Schwindt, B.; Shuaib, A., High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis* **2007**, *192*, (1), 92-9. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.06.023.
194. Nofer, J. R.; Levkau, B.; Wolinska, I.; Junker, R.; Fobker, M.; von Eckardstein, A.; Seedorf, U.; Assmann, G., Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, (37), 34480-5. doi:10.1074/jbc.M103782200.
195. Suc, I.; Escargueil-Blanc, I.; Trolly, M.; Salvayre, R.; Negre-Salvayre, A., HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1997**, *17*, (10), 2158-66. doi:10.1161/01.atv.17.10.2158.
196. 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*, (8), 891-904. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.108753.
197. Radojkovic, C.; Genoux, A.; Pons, V.; Combes, G.; de Jonge, H.; Champagne, E.; Rolland, C.; Perret, B.; Collet, X.; Terce, F.; Martinez, L. O., Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2009**, *29*, (7), 1125-30. doi:10.1161/ATVBAHA.109.187997.
198. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2003**, *23*, (7), 1283-8. doi:10.1161/01.ATV.0000079011.67194.5A.
199. 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. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, (34), 31780-5. doi:10.1074/jbc.M104353200.
200. Ruiz, M.; Okada, H.; Dahlback, B., HDL-associated ApoM is anti-apoptotic by delivering sphingosine 1-phosphate to S1P1 & S1P3 receptors on vascular endothelium. *Lipids in health and disease* **2017**, *16*, (1), 36. doi:10.1186/s12944-017-0429-2.
201. Sutter, I.; Velagapudi, S.; Othman, A.; Riwanto, M.; Manz, J.; Rohrer, L.; Rentsch, K.; Hornemann, T.; Landmesser, U.; von Eckardstein, A., Plasmalogens of high-density lipoproteins (HDL) are associated with coronary artery disease and anti-apoptotic activity of HDL. *Atherosclerosis* **2015**, *241*, (2), 539-46. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.037.
202. Tso, C.; Martinic, G.; Fan, W. H.; Rogers, C.; Rye, K. A.; Barter, P. J., High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2006**, *26*, (5), 1144-9. doi:10.1161/01.ATV.0000216600.37436.cf.

203. Tan, J. T.; Prosser, H. C.; Vanags, L. Z.; Monger, S. A.; Ng, M. K.; Bursill, C. A., High-density lipoproteins augment hypoxia-induced angiogenesis via regulation of post-translational modulation of hypoxia-inducible factor 1 α . *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2014**, *28*, (1), 206-17. doi:10.1096/fj.13-233874.
204. Jin, F.; Hagemann, N.; Sun, L.; Wu, J.; Doepfner, T. R.; Dai, Y.; Hermann, D. M., High-density lipoprotein (HDL) promotes angiogenesis via S1P3-dependent VEGFR2 activation. *Angiogenesis* **2018**, *21*, (2), 381-394. doi:10.1007/s10456-018-9603-z.
205. Cho, H. J.; Kim, H. S.; Lee, M. M.; Kim, D. H.; Yang, H. J.; Hur, J.; Hwang, K. K.; Oh, S.; Choi, Y. J.; Chae, I. H.; Oh, B. H.; Choi, Y. S.; Walsh, K.; Park, Y. B., Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation* **2003**, *108*, (23), 2918-25. doi:10.1161/01.CIR.0000097001.79750.78.
206. Hill, J. M.; Zalos, G.; Halcox, J. P.; Schenke, W. H.; Waclawiw, M. A.; Quyyumi, A. A.; Finkel, T., Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine* **2003**, *348*, (7), 593-600. doi:10.1056/NEJMoa022287.
207. Kong, D.; Melo, L. G.; Gneccchi, M.; Zhang, L.; Mostoslavsky, G.; Liew, C. C.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J., Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* **2004**, *110*, (14), 2039-46. doi:10.1161/01.CIR.0000143161.01901.BD.
208. 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. *Circulation research* **2008**, *102*, (4), 480-7. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.159079.
209. 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. *Circulation research* **2006**, *98*, (1), 63-72. doi:10.1161/01.RES.0000199272.59432.5b.
210. Chen, X.; Duong, M. N.; Nicholls, S. J.; Bursill, C., Myeloperoxidase modification of high-density lipoprotein suppresses human endothelial cell proliferation and migration via inhibition of ERK1/2 and Akt activation. *Atherosclerosis* **2018**, *273*, 75-83. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.006.
211. 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 Chen, Y.; Pennathur, S.; Zheng, L., High-density lipoprotein nitration and chlorination catalyzed by myeloperoxidase impair its effect of promoting endothelial repair. *Free radical biology & medicine* **2013**, *60*, 272-81. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.004.
212. Werner, N.; Kosiol, S.; Schiegl, T.; Ahlers, P.; Walenta, K.; Link, A.; Bohm, M.; Nickenig, G., Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England journal of medicine* **2005**, *353*, (10), 999-1007. doi:10.1056/NEJMoa043814.
213. Hu, Y.; Davison, F.; Zhang, Z.; Xu, Q., Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation* **2003**, *108*, (25), 3122-7. doi:10.1161/01.CIR.0000105722.96112.67.
214. Foteinos, G.; Hu, Y.; Xiao, Q.; Metzler, B.; Xu, Q., Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **2008**, *117*, (14), 1856-63. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746008.
215. Yin, Y.; Liu, H.; Wang, F.; Li, L.; Deng, M.; Huang, L.; Zhao, X., Transplantation of cryopreserved human umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells induces recovery of carotid artery injury in nude rats. *Stem cell research & therapy* **2015**, *6*, 37. doi:10.1186/s13287-015-0022-4.
216. Petoumenos, V.; Nickenig, G.; Werner, N., High-density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells. *Journal of cellular and molecular medicine* **2009**, *13*, (11-12), 4623-35. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00472.x.
217. Vanags, L. Z.; Tan, J. T. M.; Galougahi, K. K.; Schaefer, A.; Wise, S. G.; Murphy, A.; Ali, Z. A.; Bursill, C. A., Apolipoprotein A-I Reduces In-Stent Restenosis and Platelet Activation and Alters Neointimal Cellular Phenotype. *JACC. Basic to translational science* **2018**, *3*, (2), 200-209. doi:10.1016/j.jacbts.2017.11.006.

218. Feng, Y.; van Eck, M.; Van Craeyveld, E.; Jacobs, F.; Carlier, V.; Van Linthout, S.; Erdel, M.; Tjwa, M.; De Geest, B., Critical role of scavenger receptor-BI-expressing bone marrow-derived endothelial progenitor cells in the attenuation of allograft vasculopathy after human apo A-I transfer. *Blood* **2009**, *113*, (3), 755-64. doi:10.1182/blood-2008-06-161794.
219. van Oostrom, O.; Nieuwdorp, M.; Westerweel, P. E.; Hoefler, I. E.; Basser, R.; Stroes, E. S.; Verhaar, M. C., Reconstituted HDL increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2007**, *27*, (8), 1864-5. doi:10.1161/ATVBAHA.107.143875.
220. Werner, N.; Junk, S.; Laufs, U.; Link, A.; Walenta, K.; Bohm, M.; Nickenig, G., Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circulation research* **2003**, *93*, (2), e17-24. doi:10.1161/01.RES.0000083812.30141.74.
221. Tamagaki, T.; Sawada, S.; Imamura, H.; Tada, Y.; Yamasaki, S.; Toratani, A.; Sato, T.; Komatsu, S.; Akamatsu, N.; Yamagami, M.; Kobayashi, K.; Kato, K.; Yamamoto, K.; Shirai, K.; Yamada, K.; Higaki, T.; Nakagawa, K.; Tsuji, H.; Nakagawa, M., Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **1996**, *123*, (1-2), 73-82. doi:10.1016/0021-9150(95)05774-9.
222. Castaing-Berthou, A.; Malet, N.; Radojkovic, C.; Cabou, C.; Gayral, S.; Martinez, L. O.; Laffargue, M., PI3Kbeta Plays a Key Role in Apolipoprotein A-I-Induced Endothelial Cell Proliferation Through Activation of the Ecto-F1-ATPase/P2Y1 Receptors. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **2017**, *42*, (2), 579-593. doi:10.1159/000477607.
223. Sumi, M.; Sata, M.; Miura, S.; Rye, K. A.; Toya, N.; Kanaoka, Y.; Yanaga, K.; Ohki, T.; Saku, K.; Nagai, R., Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2007**, *27*, (4), 813-8. doi:10.1161/01.ATV.0000259299.38843.64.
224. Miura, S.; Fujino, M.; Matsuo, Y.; Kawamura, A.; Tanigawa, H.; Nishikawa, H.; Saku, K., High density lipoprotein-induced angiogenesis requires the activation of Ras/MAP kinase in human coronary artery endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2003**, *23*, (5), 802-8. doi:10.1161/01.ATV.0000066134.79956.58.
225. Miura, S.; Tanigawa, H.; Matsuo, Y.; Fujino, M.; Kawamura, A.; Saku, K., Ras/Raf1-dependent signal in sphingosine-1-phosphate-induced tube formation in human coronary artery endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2003**, *306*, (4), 924-9. doi:10.1016/s0006-291x(03)01065-9.
226. Tan, J. T.; Ng, M. K.; Bursill, C. A., The role of high-density lipoproteins in the regulation of angiogenesis. *Cardiovascular research* **2015**, *106*, (2), 184-93. doi:10.1093/cvr/cvv104.
227. Ware, J. A.; Simons, M., Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nature medicine* **1997**, *3*, (2), 158-64. doi:10.1038/nm0297-158.
228. Prosser, H. C.; Tan, J. T.; Dunn, L. L.; Patel, S.; Vanags, L. Z.; Bao, S.; Ng, M. K.; Bursill, C. A., Multifunctional regulation of angiogenesis by high-density lipoproteins. *Cardiovascular research* **2014**, *101*, (1), 145-54. doi:10.1093/cvr/cvt234.
229. Tan, J. T.; Prosser, H. C.; Dunn, L. L.; Vanags, L. Z.; Ridiandries, A.; Tsatralis, T.; Lecce, L.; Clayton, Z. E.; Yuen, S. C.; Robertson, S.; Lam, Y. T.; Celermajer, D. S.; Ng, M. K.; Bursill, C. A., High-Density Lipoproteins Rescue Diabetes-Impaired Angiogenesis via Scavenger Receptor Class B Type I. *Diabetes* **2016**, *65*, (10), 3091-103. doi:10.2337/db15-1668.
230. Tsatralis, T.; Ridiandries, A.; Robertson, S.; Vanags, L. Z.; Lam, Y. T.; Tan, J. T.; Ng, M. K.; Bursill, C. A., Reconstituted high-density lipoproteins promote wound repair and blood flow recovery in response to ischemia in aged mice. *Lipids in health and disease* **2016**, *15*, (1), 150. doi:10.1186/s12944-016-0322-4.
231. Witztum, J. L.; Steinberg, D., Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *The Journal of clinical investigation* **1991**, *88*, (6), 1785-92. doi:10.1172/JCI115499.
232. Chisolm, G. M., 3rd; Hazen, S. L.; Fox, P. L.; Cathcart, M. K., The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, (37), 25959-62. doi:10.1074/jbc.274.37.25959.
233. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, (21), 10316-20. doi:10.1073/pnas.89.21.10316.

234. Christison, J. K.; Rye, K. A.; Stocker, R., Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *Journal of lipid research* **1995**, 36, (9), 2017-26.
235. Proudfoot, J. M.; Barden, A. E.; Loke, W. M.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Mori, T. A., HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *Journal of lipid research* **2009**, 50, (4), 716-22. doi:10.1194/jlr.M800607-JLR200.
236. Navab, M.; Hama, S. Y.; Cooke, C. J.; Anantharamaiah, G. M.; Chaddha, M.; Jin, L.; Subbanagounder, G.; Faull, K. F.; Reddy, S. T.; Miller, N. E.; Fogelman, A. M., Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of lipid research* **2000**, 41, (9), 1481-94.
237. Parthasarathy, S.; Barnett, J.; Fong, L. G., High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et biophysica acta* **1990**, 1044, (2), 275-83. doi:10.1016/0005-2760(90)90314-n.
238. Ohta, T.; Takata, K.; Horiuchi, S.; Morino, Y.; Matsuda, I., Protective effect of lipoproteins containing apoprotein A-I on Cu²⁺-catalyzed oxidation of human low density lipoprotein. *FEBS letters* **1989**, 257, (2), 435-8. doi:10.1016/0014-5793(89)81590-x.
239. 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. *Journal of lipid research* **2000**, 41, (9), 1495-508.
240. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2009**, 29, (12), 2169-75. doi:10.1161/ATVBAHA.109.194555.
241. Karlsson, H.; Kontush, A.; James, R. W., Functionality of HDL: antioxidation and detoxifying effects. *Handbook of experimental pharmacology* **2015**, 224, 207-28. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_5.
242. Boisfer, E.; Stengel, D.; Pastier, D.; Laplaud, P. M.; Dousset, N.; Ninio, E.; Kalopissis, A. D., Antioxidant properties of HDL in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *Journal of lipid research* **2002**, 43, (5), 732-41.
243. Ostos, M. A.; Conconi, M.; Vergnes, L.; Baroukh, N.; Ribalta, J.; Girona, J.; Caillaud, J. M.; Ochoa, A.; Zakin, M. M., Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2001**, 21, (6), 1023-8. doi:10.1161/01.atv.21.6.1023.
244. Navab, M.; Hama-Levy, S.; Van Lenten, B. J.; Fonarow, G. C.; Cardinez, C. J.; Castellani, L. W.; Brennan, M. L.; Lusis, A. J.; Fogelman, A. M.; La Du, B. N., Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *The Journal of clinical investigation* **1997**, 99, (8), 2005-19. doi:10.1172/JCI119369.
245. 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. *The Journal of clinical investigation* **1995**, 96, (6), 2882-91. doi:10.1172/JCI118359.
246. Pajkrt, D.; Lerch, P. G.; van der Poll, T.; Levi, M.; Illi, M.; Doran, J. E.; Arnet, B.; van den Ende, A.; ten Cate, J. W.; van Deventer, S. J., Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thrombosis and haemostasis* **1997**, 77, (2), 303-7.
247. Spector, A. A.; Scanu, A. M.; Kaduce, T. L.; Figard, P. H.; Fless, G. M.; Czervionke, R. L., Effect of human plasma lipoproteins on prostacyclin production by cultured endothelial cells. *Journal of lipid research* **1985**, 26, (3), 288-97.
248. Fleisher, L. N.; Tall, A. R.; Witte, L. D.; Miller, R. W.; Cannon, P. J., Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* **1982**, 257, (12), 6653-5.
249. Pomerantz, K. B.; Fleisher, L. N.; Tall, A. R.; Cannon, P. J., Enrichment of endothelial cell arachidonate by lipid transfer from high density lipoproteins: relationship to prostaglandin I₂ synthesis. *Journal of lipid research* **1985**, 26, (10), 1269-76.

250. Calabresi, L.; Rossoni, G.; Gomaraschi, M.; Sisto, F.; Berti, F.; Franceschini, G., High-density lipoproteins protect isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury by reducing cardiac tumor necrosis factor-alpha content and enhancing prostaglandin release. *Circulation research* **2003**, 92, (3), 330-7. doi:10.1161/01.res.0000054201.60308.1a.
251. Van Sickle, W. A.; Wilcox, H. G.; Malik, K. U.; Nasjletti, A., High density lipoprotein-induced cardiac prostacyclin synthesis in vitro: relationship to cardiac arachidonate mobilization. *Journal of lipid research* **1986**, 27, (5), 517-22.
252. Norata, G. D.; Callegari, E.; Inoue, H.; Catapano, A. L., HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2004**, 24, (5), 871-7. doi:10.1161/01.ATV.zhq0504.1403.
253. Chung, D. W.; Chen, J.; Ling, M.; Fu, X.; Blevins, T.; Parsons, S.; Le, J.; Harris, J.; Martin, T. R.; Konkle, B. A.; Zheng, Y.; Lopez, J. A., High-density lipoprotein modulates thrombosis by preventing von Willebrand factor self-association and subsequent platelet adhesion. *Blood* **2016**, 127, (5), 637-45. doi:10.1182/blood-2014-09-599530.
254. 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. *Biochemical and biophysical research communications* **2012**, 420, (1), 17-23. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.103.
255. Liu, D.; Ji, L.; Tong, X.; Pan, B.; Han, J. Y.; Huang, Y.; Chen, Y. E.; Pennathur, S.; Zhang, Y.; Zheng, L., Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1. *American journal of physiology. Cell physiology* **2011**, 301, (3), C739-48. doi:10.1152/ajpcell.00055.2011.
256. Gonzalez-Diez, M.; Rodriguez, C.; Badimon, L.; Martinez-Gonzalez, J., Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thrombosis and haemostasis* **2008**, 100, (1), 119-26. doi:10.1160/TH07-11-0675.
257. Escudero, I.; Martinez-Gonzalez, J.; Alonso, R.; Mata, P.; Badimon, L., Experimental and interventional dietary study in humans on the role of HDL fatty acid composition in PGI2 release and Cox-2 expression by VSMC. *European journal of clinical investigation* **2003**, 33, (9), 779-86. doi:10.1046/j.1365-2362.2003.01221.x.
258. Martinez-Gonzalez, J.; Escudero, I.; Badimon, L., Simvastatin potentiates PGI(2) release induced by HDL in human VSMC: effect on Cox-2 up-regulation and MAPK signalling pathways activated by HDL. *Atherosclerosis* **2004**, 174, (2), 305-13. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.037.
259. Holy, E. W.; Besler, C.; Reiner, M. F.; Camici, G. G.; Manz, J.; Beer, J. H.; Luscher, T. F.; Landmesser, U.; Tanner, F. C., High-density lipoprotein from patients with coronary heart disease loses anti-thrombotic effects on endothelial cells: impact on arterial thrombus formation. *Thrombosis and haemostasis* **2014**, 112, (5), 1024-35. doi:10.1160/TH13-09-0775.
260. Ossoli, A.; Remaley, A. T.; Vaisman, B.; Calabresi, L.; Gomaraschi, M., Plasma-derived and synthetic high-density lipoprotein inhibit tissue factor in endothelial cells and monocytes. *The Biochemical journal* **2016**, 473, (2), 211-9. doi:10.1042/BJ20151000.
261. Viswambharan, H.; Ming, X. F.; Zhu, S.; Hubsch, A.; Lerch, P.; Vergeres, G.; Rusconi, S.; Yang, Z., Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circulation research* **2004**, 94, (7), 918-25. doi:10.1161/01.RES.0000124302.20396.B7.
262. O'Connell, B. J.; Genest, J., Jr., High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* **2001**, 104, (16), 1978-83. doi:10.1161/hc3901.096667.
263. Cockerill, G. W.; Saklatvala, J.; Ridley, S. H.; Yarwood, H.; Miller, N. E.; Oral, B.; Nithyanathan, S.; Taylor, G.; Haskard, D. O., High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1999**, 19, (4), 910-7. doi:10.1161/01.atv.19.4.910.
264. 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. *The Journal of clinical investigation* **1999**, 103, (2), 219-27. doi:10.1172/JCI5006.

265. Deguchi, H.; Fernandez, J. A.; Griffin, J. H., Neutral glycosphingolipid-dependent inactivation of coagulation factor Va by activated protein C and protein S. *The Journal of biological chemistry* **2002**, 277, (11), 8861-5. doi:10.1074/jbc.M110252200.
266. Deguchi, H.; Yegneswaran, S.; Griffin, J. H., Sphingolipids as bioactive regulators of thrombin generation. *The Journal of biological chemistry* **2004**, 279, (13), 12036-42. doi:10.1074/jbc.M302531200.
267. Annema, W.; von Eckardstein, A., Dysfunctional high-density lipoproteins in coronary heart disease: implications for diagnostics and therapy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **2016**, 173, 30-57. doi:10.1016/j.trsl.2016.02.008.
268. Patel, P. J.; Khera, A. V.; Jafri, K.; Wilensky, R. L.; Rader, D. J., The anti-oxidative capacity of high-density lipoprotein is reduced in acute coronary syndrome but not in stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* **2011**, 58, (20), 2068-75. doi:10.1016/j.jacc.2011.08.030.
269. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2001**, 21, (4), 481-8. doi:10.1161/01.atv.21.4.481.
270. 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, (22), 2751-6. doi:10.1161/01.CIR.0000103624.14436.4B.
271. Kim, J. B.; Hama, S.; Hough, G.; Navab, M.; Fogelman, A. M.; Maclellan, W. R.; Horwich, T. B.; Fonarow, G. C., Heart failure is associated with impaired anti-inflammatory and antioxidant properties of high-density lipoproteins. *The American journal of cardiology* **2013**, 112, (11), 1770-7. doi:10.1016/j.amjcard.2013.07.045.
272. Patel, P. J.; Khera, A. V.; Wilensky, R. L.; Rader, D. J., Anti-oxidative and cholesterol efflux capacities of high-density lipoprotein are reduced in ischaemic cardiomyopathy. *European journal of heart failure* **2013**, 15, (11), 1215-9. doi:10.1093/eurjhf/hft084.
273. Ortiz-Munoz, G.; Couret, D.; Lapergue, B.; Bruckert, E.; Meseguer, E.; Amarenco, P.; Meilhac, O., Dysfunctional HDL in acute stroke. *Atherosclerosis* **2016**, 253, 75-80. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.035.
274. Srivastava, R. A. K., Dysfunctional HDL in diabetes mellitus and its role in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Molecular and cellular biochemistry* **2018**, 440, (1-2), 167-187. doi:10.1007/s11010-017-3165-z.
275. Ganjali, S.; Momtazi, A. A.; Banach, M.; Kovanen, P. T.; Stein, E. A.; Sahebkar, A., HDL abnormalities in familial hypercholesterolemia: Focus on biological functions. *Progress in lipid research* **2017**, 67, 16-26. doi:10.1016/j.plipres.2017.05.001.
276. Connelly, M. A.; Shalaurova, I.; Otvos, J. D., High-density lipoprotein and inflammation in cardiovascular disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **2016**, 173, 7-18. doi:10.1016/j.trsl.2016.01.006.
277. 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. *The Journal of clinical investigation* **1995**, 96, (6), 2758-67. doi:10.1172/JCI118345.
278. Rached, F.; Lhomme, M.; Camont, L.; Gomes, F.; Dautuille, C.; Robillard, P.; Santos, R. D.; Lesnik, P.; Serrano, C. V., Jr.; Chapman, M. J.; Kontush, A., Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A. *Biochimica et biophysica acta* **2015**, 1851, (9), 1254-61. doi:10.1016/j.bbailip.2015.05.007.
279. 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. *Nature reviews. Cardiology* **2016**, 13, (1), 48-60. doi:10.1038/nrcardio.2015.124.
280. Shao, B.; Pennathur, S.; Heinecke, J. W., Myeloperoxidase targets apolipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic

- lesions. *The Journal of biological chemistry* **2012**, 287, (9), 6375-86. doi:10.1074/jbc.M111.337345.
281. 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. *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280, (1), 38-47. doi:10.1074/jbc.M407019200.
282. Bergt, C.; Pennathur, S.; Fu, X.; Byun, J.; O'Brien, K.; McDonald, T. O.; Singh, P.; Anantharamaiah, G. M.; Chait, A.; Brunzell, J.; Geary, R. L.; Oram, J. F.; Heinecke, J. W., The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, (35), 13032-7. doi:10.1073/pnas.0405292101.
283. Hewing, B.; Parathath, S.; Barrett, T.; Chung, W. K.; Astudillo, Y. M.; Hamada, T.; Ramkhalawon, B.; Tallant, T. C.; Yusufshaq, M. S.; Didonato, J. A.; Huang, Y.; Buffa, J.; Berisha, S. Z.; Smith, J. D.; Hazen, S. L.; Fisher, E. A., Effects of native and myeloperoxidase-modified apolipoprotein a-I on reverse cholesterol transport and atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2014**, 34, (4), 779-89. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303044.
284. 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. *The Journal of biological chemistry* **2009**, 284, (45), 30825-35. doi:10.1074/jbc.M109.047605.
285. Hedrick, C. C.; Thorpe, S. R.; Fu, M. X.; Harper, C. M.; Yoo, J.; Kim, S. M.; Wong, H.; Peters, A. L., Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* **2000**, 43, (3), 312-20. doi:10.1007/s001250050049.
286. Nobecourt, E.; Tabet, F.; Lambert, G.; Puranik, R.; Bao, S.; Yan, L.; Davies, M. J.; Brown, B. E.; Jenkins, A. J.; Dusting, G. J.; Bonnet, D. J.; Curtiss, L. K.; Barter, P. J.; Rye, K. A., Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2010**, 30, (4), 766-72. doi:10.1161/ATVBAHA.109.201715.
287. Ordovas, J. M.; Litwack-Klein, L.; Wilson, P. W.; Schaefer, M. M.; Schaefer, E. J., Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apoE1 and apoE5 isoforms. *Journal of lipid research* **1987**, 28, (4), 371-80.
288. Rall, S. C., Jr.; Mahley, R. W., The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *Journal of internal medicine* **1992**, 231, (6), 653-9. doi:10.1111/j.1365-2796.1992.tb01254.x.
289. Eichner, J. E.; Dunn, S. T.; Perveen, G.; Thompson, D. M.; Stewart, K. E.; Stroehla, B. C., Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology* **2002**, 155, (6), 487-95. doi:10.1093/aje/155.6.487.
290. Innerarity, T. L.; Weisgraber, K. H.; Arnold, K. S.; Rall, S. C., Jr.; Mahley, R. W., Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2. Evidence for modulation of the binding site conformation. *The Journal of biological chemistry* **1984**, 259, (11), 7261-7.
291. Mamotte, C. D.; Sturm, M.; Foo, J. I.; van Bockxmeer, F. M.; Taylor, R. R., Comparison of the LDL-receptor binding of VLDL and LDL from apoE4 and apoE3 homozygotes. *The American journal of physiology* **1999**, 276, (3), E553-7. doi:10.1152/ajpendo.1999.276.3.E553.
292. Saito, H.; Dhanasekaran, P.; Baldwin, F.; Weisgraber, K. H.; Phillips, M. C.; Lund-Katz, S., Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, (42), 40723-9. doi:10.1074/jbc.M304814200.
293. Dong, L. M.; Weisgraber, K. H., Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* **1996**, 271, (32), 19053-7. doi:10.1074/jbc.271.32.19053.
294. Mahley, R. W.; Rall, S. C., Jr., Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual review of genomics and human genetics* **2000**, 1, 507-37. doi:10.1146/annurev.genom.1.1.507.
295. Koopal, C.; Marais, A. D.; Visseren, F. L., Familial dysbetalipoproteinemia: an underdiagnosed lipid disorder. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* **2017**, 24, (2), 133-139. doi:10.1097/MED.0000000000000316.

296. Xu, M.; Zhao, J.; Zhang, Y.; Ma, X.; Dai, Q.; Zhi, H.; Wang, B.; Wang, L., Apolipoprotein E Gene Variants and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. *BioMed research international* **2016**, 2016, 3912175. doi:10.1155/2016/3912175.
297. Zhang, Y.; Tang, H. Q.; Peng, W. J.; Zhang, B. B.; Liu, M., Meta-analysis for the Association of Apolipoprotein E epsilon2/epsilon3/epsilon4 Polymorphism with Coronary Heart Disease. *Chinese medical journal* **2015**, 128, (10), 1391-8. doi:10.4103/0366-6999.156803.
298. Song, Y.; Stampfer, M. J.; Liu, S., Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of internal medicine* **2004**, 141, (2), 137-47. doi:10.7326/0003-4819-141-2-200407200-00013.
299. Wilson, P. W.; Schaefer, E. J.; Larson, M. G.; Ordovas, J. M., Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1996**, 16, (10), 1250-5. doi:10.1161/01.atv.16.10.1250.
300. Eichner, J. E.; Kuller, L. H.; Orchard, T. J.; Grandits, G. A.; McCallum, L. M.; Ferrell, R. E.; Neaton, J. D., Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *The American journal of cardiology* **1993**, 71, (2), 160-5. doi:10.1016/0002-9149(93)90732-r.
301. Bennet, A. M.; Di Angelantonio, E.; Ye, Z.; Wensley, F.; Dahlin, A.; Ahlbom, A.; Keavney, B.; Collins, R.; Wiman, B.; de Faire, U.; Danesh, J., Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *Jama* **2007**, 298, (11), 1300-11. doi:10.1001/jama.298.11.1300.
302. Stengard, J. H.; Weiss, K. M.; Sing, C. F., An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Human genetics* **1998**, 103, (2), 234-41. doi:10.1007/s004390050811.
303. Dallongeville, J.; Lussier-Cacan, S.; Davignon, J., Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *Journal of lipid research* **1992**, 33, (4), 447-54.
304. Hanh, N. T.; Nhung, B. T.; Dao, D. T.; Tuyet, L. T.; Hop, L. T.; Binh, T. Q.; Thuc, V. T., Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipid disorders, independent of obesity-related traits in Vietnamese children. *Lipids in health and disease* **2016**, 15, (1), 176. doi:10.1186/s12944-016-0349-6.
305. Zende, P. D.; Bankar, M. P.; Kamble, P. S.; Momin, A. A., Apolipoprotein e gene polymorphism and its effect on plasma lipids in arteriosclerosis. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **2013**, 7, (10), 2149-52. doi:10.7860/JCDR/2013/6195.3455.
306. El-Lebedy, D.; Raslan, H. M.; Mohammed, A. M., Apolipoprotein E gene polymorphism and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Cardiovascular diabetology* **2016**, 15, 12. doi:10.1186/s12933-016-0329-1.
307. Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Risch, N. J.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C., Jr.; Rimmler, J. B.; Locke, P. A.; Conneally, P. M.; Schmechel, K. E.; et al., Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics* **1994**, 7, (2), 180-4. doi:10.1038/ng0694-180.
308. Ye, S.; Huang, Y.; Mullendorff, K.; Dong, L.; Giedt, G.; Meng, E. C.; Cohen, F. E.; Kuntz, I. D.; Weisgraber, K. H.; Mahley, R. W., Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (51), 18700-5. doi:10.1073/pnas.0508693102.
309. Yin, Y.; Wang, Z., ApoE and Neurodegenerative Diseases in Aging. *Advances in experimental medicine and biology* **2018**, 1086, 77-92. doi:10.1007/978-981-13-1117-8_5.
310. Curtiss, L. K.; Boisvert, W. A., Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* **2000**, 11, (3), 243-51. doi:10.1097/00041433-200006000-00004.
311. Bouchareychas, L.; Raffai, R. L., Apolipoprotein E and Atherosclerosis: From Lipoprotein Metabolism to MicroRNA Control of Inflammation. *Journal of cardiovascular development and disease* **2018**, 5, (2), doi:10.3390/jcdd5020030.
312. Schaefer, E. J.; Gregg, R. E.; Ghiselli, G.; Forte, T. M.; Ordovas, J. M.; Zech, L. A.; Brewer, H. B., Jr., Familial apolipoprotein E deficiency. *The Journal of clinical investigation* **1986**, 78, (5), 1206-19. doi:10.1172/JCI112704.

313. Ghiselli, G.; Schaefer, E. J.; Gascon, P.; Bresler, H. B., Jr., Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* **1981**, 214, (4526), 1239-41. doi:10.1126/science.6795720.
314. Plump, A. S.; Smith, J. D.; Hayek, T.; Aalto-Setälä, K.; Walsh, A.; Verstuyft, J. G.; Rubin, E. M.; Breslow, J. L., Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **1992**, 71, (2), 343-53. doi:10.1016/0092-8674(92)90362-g.
315. Zhang, S. H.; Reddick, R. L.; Piedrahita, J. A.; Maeda, N., Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **1992**, 258, (5081), 468-71. doi:10.1126/science.1411543.
316. Zhang, S. H.; Reddick, R. L.; Burkey, B.; Maeda, N., Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *The Journal of clinical investigation* **1994**, 94, (3), 937-45. doi:10.1172/JCI117460.
317. Nakashima, Y.; Plump, A. S.; Raines, E. W.; Breslow, J. L.; Ross, R., ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* **1994**, 14, (1), 133-40. doi:10.1161/01.atv.14.1.133.
318. Tsukamoto, K.; Tangirala, R.; Chun, S. H.; Pure, E.; Rader, D. J., Rapid regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of ApoE in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1999**, 19, (9), 2162-70. doi:10.1161/01.atv.19.9.2162.
319. Shimano, H.; Yamada, N.; Katsuki, M.; Shimada, M.; Gotoda, T.; Harada, K.; Murase, T.; Fukazawa, C.; Takaku, F.; Yazaki, Y., Overexpression of apolipoprotein E in transgenic mice: marked reduction in plasma lipoproteins except high density lipoprotein and resistance against diet-induced hypercholesterolemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, (5), 1750-4. doi:10.1073/pnas.89.5.1750.
320. Valanti, E. K.; Chroni, A.; Sanoudou, D., The future of apolipoprotein E mimetic peptides in the prevention of cardiovascular disease. *Current opinion in lipidology* **2019**, 30, (4), 326-341. doi:10.1097/MOL.0000000000000615.
321. Rosenfeld, M. E.; Butler, S.; Ord, V. A.; Lipton, B. A.; Dyer, C. A.; Curtiss, L. K.; Palinski, W.; Witztum, J. L., Abundant expression of apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* **1993**, 13, (9), 1382-9. doi:10.1161/01.atv.13.9.1382.
322. Fazio, S.; Babaev, V. R.; Burleigh, M. E.; Major, A. S.; Hasty, A. H.; Linton, M. F., Physiological expression of macrophage apoE in the artery wall reduces atherosclerosis in severely hyperlipidemic mice. *Journal of lipid research* **2002**, 43, (10), 1602-9. doi:10.1194/jlr.m200108-jlr200.
323. Li, K.; Ching, D.; Luk, F. S.; Raffai, R. L., Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor-kappaB-driven inflammation and atherosclerosis. *Circulation research* **2015**, 117, (1), e1-e11. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305844.
324. Van Eck, M.; Herijgers, N.; Vidgeon-Hart, M.; Pearce, N. J.; Hoogerbrugge, P. M.; Groot, P. H.; Van Berkel, T. J., Accelerated atherosclerosis in C57Bl/6 mice transplanted with ApoE-deficient bone marrow. *Atherosclerosis* **2000**, 150, (1), 71-80. doi:10.1016/s0021-9150(99)00372-x.
325. Fazio, S.; Babaev, V. R.; Murray, A. B.; Hasty, A. H.; Carter, K. J.; Gleaves, L. A.; Atkinson, J. B.; Linton, M. F., Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, (9), 4647-52. doi:10.1073/pnas.94.9.4647.
326. Shimano, H.; Ohsuga, J.; Shimada, M.; Namba, Y.; Gotoda, T.; Harada, K.; Katsuki, M.; Yazaki, Y.; Yamada, N., Inhibition of diet-induced atheroma formation in transgenic mice expressing apolipoprotein E in the arterial wall. *The Journal of clinical investigation* **1995**, 95, (2), 469-76. doi:10.1172/JCI117687.
327. Hasty, A. H.; Linton, M. F.; Brandt, S. J.; Babaev, V. R.; Gleaves, L. A.; Fazio, S., Retroviral gene therapy in ApoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation. *Circulation* **1999**, 99, (19), 2571-6. doi:10.1161/01.cir.99.19.2571.

328. Van Eck, M.; Herijgers, N.; Yates, J.; Pearce, N. J.; Hoogerbrugge, P. M.; Groot, P. H.; Van Berkel, T. J., Bone marrow transplantation in apolipoprotein E-deficient mice. Effect of ApoE gene dosage on serum lipid concentrations, (beta)VLDL catabolism, and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1997**, *17*, (11), 3117-26. doi:10.1161/01.atv.17.11.3117.
329. Linton, M. F.; Atkinson, J. B.; Fazio, S., Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* **1995**, *267*, (5200), 1034-7. doi:10.1126/science.7863332.
330. Mahley, R. W.; Huang, Y.; Rall, S. C., Jr., Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *Journal of lipid research* **1999**, *40*, (11), 1933-49.
331. Kypreos, K. E.; Zannis, V. I., LDL receptor deficiency or apoE mutations prevent remnant clearance and induce hypertriglyceridemia in mice. *Journal of lipid research* **2006**, *47*, (3), 521-9. doi:10.1194/jlr.M500322-JLR200.
332. Mahley, R. W.; Ji, Z. S., Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of lipid research* **1999**, *40*, (1), 1-16.
333. Linton, M. F.; Hasty, A. H.; Babaev, V. R.; Fazio, S., Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *The Journal of clinical investigation* **1998**, *101*, (8), 1726-36. doi:10.1172/JCI12181.
334. Kuipers, F.; Jong, M. C.; Lin, Y.; Eck, M.; Havinga, R.; Bloks, V.; Verkade, H. J.; Hofker, M. H.; Moshage, H.; Berkel, T. J.; Vonk, R. J.; Havekes, L. M., Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes. *The Journal of clinical investigation* **1997**, *100*, (11), 2915-22. doi:10.1172/JCI119841.
335. Huang, Y.; Liu, X. Q.; Rall, S. C., Jr.; Taylor, J. M.; von Eckardstein, A.; Assmann, G.; Mahley, R. W., Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, (41), 26388-93. doi:10.1074/jbc.273.41.26388.
336. Thuren, T.; Weisgraber, K. H.; Sisson, P.; Waite, M., Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins. *Biochemistry* **1992**, *31*, (8), 2332-8. doi:10.1021/bi00123a018.
337. Kinoshita, M.; Arai, H.; Fukasawa, M.; Watanabe, T.; Tsukamoto, K.; Hashimoto, Y.; Inoue, K.; Kurokawa, K.; Teramoto, T., Apolipoprotein E enhances lipid exchange between lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein. *Journal of lipid research* **1993**, *34*, (2), 261-8.
338. De Pauw, M.; Vanloo, B.; Weisgraber, K.; Rosseneu, M., Comparison of lipid-binding and lecithin:cholesterol acyltransferase activation of the amino- and carboxyl-terminal domains of human apolipoprotein E3. *Biochemistry* **1995**, *34*, (34), 10953-66. doi:10.1021/bi00034a030.
339. Getz, G. S.; Reardon, C. A., Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. *International journal of molecular sciences* **2018**, *19*, (11), doi:10.3390/ijms19113479.
340. Hayek, T.; Oiknine, J.; Brook, J. G.; Aviram, M., Role of HDL apolipoprotein E in cellular cholesterol efflux: studies in apo E knockout transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications* **1994**, *205*, (2), 1072-8. doi:10.1006/bbrc.1994.2775.
341. Mazzone, T.; Reardon, C., Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. *Journal of lipid research* **1994**, *35*, (8), 1345-53.
342. Dory, L., Regulation of apolipoprotein E secretion by high density lipoprotein 3 in mouse macrophages. *Journal of lipid research* **1991**, *32*, (5), 783-92.
343. Lin, C. Y.; Duan, H.; Mazzone, T., Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. *Journal of lipid research* **1999**, *40*, (9), 1618-27.
344. Lin, C. Y.; Lucas, M.; Mazzone, T., Endogenous apoE expression modulates HDL3 binding to macrophages. *Journal of lipid research* **1998**, *39*, (2), 293-301.
345. Rees, D.; Sloane, T.; Jessup, W.; Dean, R. T.; Kritharides, L., Apolipoprotein A-I stimulates secretion of apolipoprotein E by foam cell macrophages. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, (39), 27925-33. doi:10.1074/jbc.274.39.27925.
346. Boisvert, W. A.; Black, A. S.; Curtiss, L. K., ApoA1 reduces free cholesterol accumulation in atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice transplanted with ApoE-expressing

- macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1999**, 19, (3), 525-30. doi:10.1161/01.atv.19.3.525.
347. Cullen, P.; Cignarella, A.; Brennhause, B.; Mohr, S.; Assmann, G.; von Eckardstein, A., Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. *The Journal of clinical investigation* **1998**, 101, (8), 1670-7. doi:10.1172/JCI119887.
348. Gough, P. J.; Raines, E. W., Gene therapy of apolipoprotein E-deficient mice using a novel macrophage-specific retroviral vector. *Blood* **2003**, 101, (2), 485-91. doi:10.1182/blood-2002-07-2131.
349. Thorngate, F. E.; Yancey, P. G.; Kellner-Weibel, G.; Rudel, L. L.; Rothblat, G. H.; Williams, D. L., Testing the role of apoA-I, HDL, and cholesterol efflux in the atheroprotective action of low-level apoE expression. *Journal of lipid research* **2003**, 44, (12), 2331-8. doi:10.1194/jlr.M300224-JLR200.
350. Thorngate, F. E.; Rudel, L. L.; Walzem, R. L.; Williams, D. L., Low levels of extrahepatic nonmacrophage ApoE inhibit atherosclerosis without correcting hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2000**, 20, (8), 1939-45. doi:10.1161/01.atv.20.8.1939.
351. Sacre, S. M.; Stannard, A. K.; Owen, J. S., Apolipoprotein E (apoE) isoforms differentially induce nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS letters* **2003**, 540, (1-3), 181-7. doi:10.1016/s0014-5793(03)00261-8.
352. Stannard, A. K.; Riddell, D. R.; Sacre, S. M.; Tagalakis, A. D.; Langer, C.; von Eckardstein, A.; Cullen, P.; Athanasopoulos, T.; Dickson, G.; Owen, J. S., Cell-derived apolipoprotein E (ApoE) particles inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **2001**, 276, (49), 46011-6. doi:10.1074/jbc.M104812200.
353. Ulrich, V.; Konaniah, E. S.; Herz, J.; Gerard, R. D.; Jung, E.; Yuhanna, I. S.; Ahmed, M.; Hui, D. Y.; Mineo, C.; Shaul, P. W., Genetic variants of ApoE and ApoER2 differentially modulate endothelial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, 111, (37), 13493-8. doi:10.1073/pnas.1402106111.
354. Gaudreault, N.; Kumar, N.; Posada, J. M.; Stephens, K. B.; Reyes de Mochel, N. S.; Eberle, D.; Olivas, V. R.; Kim, R. Y.; Harms, M. J.; Johnson, S.; Messina, L. M.; Rapp, J. H.; Raffai, R. L., ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2012**, 32, (2), 264-72. doi:10.1161/ATVBAHA.111.238964.
355. Murphy, A. J.; Akhtari, M.; Tolani, S.; Pagler, T.; Bijl, N.; Kuo, C. L.; Wang, M.; Sanson, M.; Abramowicz, S.; Welch, C.; Bochem, A. E.; Kuivenhoven, J. A.; Yvan-Charvet, L.; Tall, A. R., ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *The Journal of clinical investigation* **2011**, 121, (10), 4138-49. doi:10.1172/JCI57559.
356. Kothapalli, D.; Liu, S. L.; Bae, Y. H.; Monslow, J.; Xu, T.; Hawthorne, E. A.; Byfield, F. J.; Castagnino, P.; Rao, S.; Rader, D. J.; Pure, E.; Phillips, M. C.; Lund-Katz, S.; Janmey, P. A.; Assoian, R. K., Cardiovascular protection by ApoE and ApoE-HDL linked to suppression of ECM gene expression and arterial stiffening. *Cell reports* **2012**, 2, (5), 1259-71. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.018.
357. Baitsch, D.; Bock, H. H.; Engel, T.; Telgmann, R.; Muller-Tidow, C.; Varga, G.; Bot, M.; Herz, J.; Robenek, H.; von Eckardstein, A.; Nofer, J. R., Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2011**, 31, (5), 1160-8. doi:10.1161/ATVBAHA.111.222745.
358. Kadl, A.; Meher, A. K.; Sharma, P. R.; Lee, M. Y.; Doran, A. C.; Johnstone, S. R.; Elliott, M. R.; Gruber, F.; Han, J.; Chen, W.; Kensler, T.; Ravichandran, K. S.; Isakson, B. E.; Wamhoff, B. R.; Leitinger, N., Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation research* **2010**, 107, (6), 737-46. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215715.
359. Feig, J. E.; Rong, J. X.; Shamir, R.; Sanson, M.; Vengrenyuk, Y.; Liu, J.; Rayner, K.; Moore, K.; Garabedian, M.; Fisher, E. A., HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, (17), 7166-71. doi:10.1073/pnas.1016086108.
360. Serhan, C. N.; Yang, R.; Martinod, K.; Kasuga, K.; Pillai, P. S.; Porter, T. F.; Oh, S. F.; Spite, M., Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine* **2009**, 206, (1), 15-23. doi:10.1084/jem.20081880.
361. Rahman, K.; Vengrenyuk, Y.; Ramsey, S. A.; Vila, N. R.; Girgis, N. M.; Liu, J.; Gusarova, V.; Gromada, J.; Weinstock, A.; Moore, K. J.; Loke, P.; Fisher, E. A., Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. *The Journal of clinical investigation* **2017**, 127, (8), 2904-2915. doi:10.1172/JCI75005.
362. Duan, H.; Li, Z.; Mazzone, T., Tumor necrosis factor-alpha modulates monocyte/macrophage apolipoprotein E gene expression. *The Journal of clinical investigation* **1995**, 96, (2), 915-22. doi:10.1172/JCI118139.
363. Brand, K.; Mackman, N.; Curtiss, L. K., Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *The Journal of clinical investigation* **1993**, 91, (5), 2031-9. doi:10.1172/JCI116425.
364. Tenger, C.; Zhou, X., Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigen-presenting cell. *Immunology* **2003**, 109, (3), 392-7. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01665.x.
365. Hui, D. Y.; Harmony, J. A.; Innerarity, T. L.; Mahley, R. W., Immunoregulatory plasma lipoproteins. Role of apolipoprotein E and apolipoprotein B. *The Journal of biological chemistry* **1980**, 255, (24), 11775-81.
366. Pepe, M. G.; Curtiss, L. K., Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *Journal of immunology* **1986**, 136, (10), 3716-23.
367. Kelly, M. E.; Clay, M. A.; Mistry, M. J.; Hsieh-Li, H. M.; Harmony, J. A., Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cellular immunology* **1994**, 159, (2), 124-39. doi:10.1006/cimm.1994.1302.
368. Hui, D. Y.; Harmony, J. A., Inhibition of Ca²⁺ accumulation in mitogen-activated lymphocytes: role of membrane-bound plasma lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, 77, (8), 4764-8. doi:10.1073/pnas.77.8.4764.
369. Avila, E. M.; Holdsworth, G.; Sasaki, N.; Jackson, R. L.; Harmony, J. A., Apolipoprotein E suppresses phytohemagglutinin-activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of biological chemistry* **1982**, 257, (10), 5900-9.
370. Mistry, M. J.; Clay, M. A.; Kelly, M. E.; Steiner, M. A.; Harmony, J. A., Apolipoprotein E restricts interleukin-dependent T lymphocyte proliferation at the G1A/G1B boundary. *Cellular immunology* **1995**, 160, (1), 14-23. doi:10.1016/0008-8749(95)80004-3.
371. Ishigami, M.; Swertfeger, D. K.; Hui, M. S.; Granholm, N. A.; Hui, D. Y., Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2000**, 20, (4), 1020-6. doi:10.1161/01.atv.20.4.1020.
372. Kothapalli, D.; Castagnino, P.; Rader, D. J.; Phillips, M. C.; Lund-Katz, S.; Assoian, R. K., Apolipoprotein E-mediated cell cycle arrest linked to p27 and the Cox2-dependent repression of miR221/222. *Atherosclerosis* **2013**, 227, (1), 65-71. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.003.
373. Swertfeger, D. K.; Hui, D. Y., Apolipoprotein E receptor binding versus heparan sulfate proteoglycan binding in its regulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *The Journal of biological chemistry* **2001**, 276, (27), 25043-8. doi:10.1074/jbc.M102357200.
374. Kothapalli, D.; Fuki, I.; Ali, K.; Stewart, S. A.; Zhao, L.; Yahil, R.; Kwiatkowski, D.; Hawthorne, E. A.; FitzGerald, G. A.; Phillips, M. C.; Lund-Katz, S.; Pure, E.; Rader, D. J.; Assoian, R. K., Antimitogenic effects of HDL and APOE mediated by Cox-2-dependent IP activation. *The Journal of clinical investigation* **2004**, 113, (4), 609-18. doi:10.1172/JCI19097.
375. Swertfeger, D. K.; Bu, G.; Hui, D. Y., Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E inhibition of smooth muscle cell migration. *The Journal of biological chemistry* **2002**, 277, (6), 4141-6. doi:10.1074/jbc.M109124200.

376. Zhu, Y.; Hui, D. Y., Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, (38), 36257-63. doi:10.1074/jbc.M303171200.
377. Masuda, T.; Shimazawa, M.; Hashimoto, Y.; Kojima, A.; Nakamura, S.; Suemori, S.; Mochizuki, K.; Kawakami, H.; Kawase, K.; Hara, H., Apolipoprotein E2 and E3, but Not E4, Promote Retinal Pathologic Neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* **2017**, 58, (2), 1208-1217. doi:10.1167/iovs.16-20539.
378. DeKroon, R. M.; Mihovilovic, M.; Goodger, Z. V.; Robinette, J. B.; Sullivan, P. M.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J., ApoE genotype-specific inhibition of apoptosis. *Journal of lipid research* **2003**, 44, (8), 1566-73. doi:10.1194/jlr.M300097-JLR200.
379. Miyata, M.; Smith, J. D., Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nature genetics* **1996**, 14, (1), 55-61. doi:10.1038/ng0996-55.
380. Palinski, W.; Ord, V. A.; Plump, A. S.; Breslow, J. L.; Steinberg, D.; Witztum, J. L., ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* **1994**, 14, (4), 605-16. doi:10.1161/01.atv.14.4.605.
381. Desai, K.; Bruckdorfer, K. R.; Hutton, R. A.; Owen, J. S., Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *Journal of lipid research* **1989**, 30, (6), 831-40.
382. Higashihara, M.; Kinoshita, M.; Teramoto, T.; Kume, S.; Kurokawa, K., The role of apoE in inhibitory effects of apoE-rich HDL on platelet function. *FEBS letters* **1991**, 282, (1), 82-6. doi:10.1016/0014-5793(91)80449-d.
383. Riddell, D. R.; Graham, A.; Owen, J. S., Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *The Journal of biological chemistry* **1997**, 272, (1), 89-95. doi:10.1074/jbc.272.1.89.
384. Riddell, D. R.; Vinogradov, D. V.; Stannard, A. K.; Chadwick, N.; Owen, J. S., Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *Journal of lipid research* **1999**, 40, (10), 1925-30.
385. Gomasaschi, M.; Adorni, M. P.; Banach, M.; Bernini, F.; Franceschini, G.; Calabresi, L., Effects of established hypolipidemic drugs on HDL concentration, subclass distribution, and function. *Handbook of experimental pharmacology* **2015**, 224, 593-615. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_19.
386. Jafri, H.; Alsheikh-Ali, A. A.; Karas, R. H., Meta-analysis: statin therapy does not alter the association between low levels of high-density lipoprotein cholesterol and increased cardiovascular risk. *Annals of internal medicine* **2010**, 153, (12), 800-8. doi:10.7326/0003-4819-153-12-201012210-00006.
387. Talbot, D.; Delaney, J. A. C.; Sandfort, V.; Herrington, D. M.; McClelland, R. L., Importance of the lipid-related pathways in the association between statins, mortality, and cardiovascular disease risk: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Pharmacoepidemiology and drug safety* **2018**, 27, (4), 365-372. doi:10.1002/pds.4393.
388. Investigators, A.-H.; Boden, W. E.; Probstfield, J. L.; Anderson, T.; Chaitman, B. R.; Desvignes-Nickens, P.; Koprowicz, K.; McBride, R.; Teo, K.; Weintraub, W., Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *The New England journal of medicine* **2011**, 365, (24), 2255-67. doi:10.1056/NEJMoa1107579.
389. Group, A. S.; Ginsberg, H. N.; Elam, M. B.; Lovato, L. C.; Crouse, J. R., 3rd; Leiter, L. A.; Linz, P.; Friedewald, W. T.; Buse, J. B.; Gerstein, H. C.; Probstfield, J.; Grimm, R. H.; Ismail-Beigi, F.; Bigger, J. T.; Goff, D. C., Jr.; Cushman, W. C.; Simons-Morton, D. G.; Byington, R. P., Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* **2010**, 362, (17), 1563-74. doi:10.1056/NEJMoa1001282.
390. Hafiane, A.; Genest, J., HDL, Atherosclerosis, and Emerging Therapies. *Cholesterol* **2013**, 2013, 891403. doi:10.1155/2013/891403.
391. 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, (17), 2121-6. doi:10.1161/01.CIR.0000092889.24713.DC.

392. Jaye, M.; Krawiec, J., Endothelial lipase and HDL metabolism. *Current opinion in lipidology* **2004**, 15, (2), 183-9. doi:10.1097/00041433-200404000-00011.
393. Barter, P. J.; Caulfield, M.; Eriksson, M.; Grundy, S. M.; Kastelein, J. J.; Komajda, M.; Lopez-Sendon, J.; Mosca, L.; Tardif, J. C.; Waters, D. D.; Shear, C. L.; Revkin, J. H.; Buhr, K. A.; Fisher, M. R.; Tall, A. R.; Brewer, B.; Investigators, I., Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *The New England journal of medicine* **2007**, 357, (21), 2109-22. doi:10.1056/NEJMoa0706628.
394. Frikke-Schmidt, R.; Nordestgaard, B. G.; Stene, M. C.; Sethi, A. A.; Remaley, A. T.; Schnohr, P.; Grande, P.; Tybjaerg-Hansen, A., Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease. *Jama* **2008**, 299, (21), 2524-32. doi:10.1001/jama.299.21.2524.
395. 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 Faire, U.; 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 Boer, 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, N. 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.; Buyschaert, 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.; Ardisino, 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, (9841), 572-80. doi:10.1016/S0140-6736(12)60312-2.
396. Haase, C. L.; Tybjaerg-Hansen, A.; Qayyum, A. A.; Schou, J.; Nordestgaard, B. G.; Frikke-Schmidt, R., LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2012**, 97, (2), E248-56. doi:10.1210/jc.2011-1846.
397. Kypreos, K. E.; Gkizas, S.; Rallidis, L. S.; Karagiannides, I., HDL particle functionality as a primary pharmacological target for HDL-based therapies. *Biochemical pharmacology* **2013**, 85, (11), 1575-8. doi:10.1016/j.bcp.2013.03.004.
398. Darabi, M.; Guillas-Baudouin, I.; Le Goff, W.; Chapman, M. J.; Kontush, A., Therapeutic applications of reconstituted HDL: When structure meets function. *Pharmacology & therapeutics* **2016**, 157, 28-42. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.10.010.
399. Stoekenbroek, R. M.; Stroes, E. S.; Hovingh, G. K., ApoA-I mimetics. *Handbook of experimental pharmacology* **2015**, 224, 631-48. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_21.
400. Sirtori, C. R.; Calabresi, L.; Franceschini, G.; Baldassarre, D.; Amato, M.; Johansson, J.; Salvetti, M.; Monteduro, C.; Zulli, R.; Muiesan, M. L.; Agabiti-Rosei, E., Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation* **2001**, 103, (15), 1949-54. doi:10.1161/01.cir.103.15.1949.
401. Chiesa, G.; Sirtori, C. R., Recombinant apolipoprotein A-I(Milano): a novel agent for the induction of regression of atherosclerotic plaques. *Annals of medicine* **2003**, 35, (4), 267-73. doi:10.1080/07853890310005281.
402. 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, (25), 3215-20. doi:10.1161/01.CIR.0000134275.90823.87.

403. Uehara, Y.; Ando, S.; Yahiro, E.; Oniki, K.; Ayaori, M.; Abe, S.; Kawachi, E.; Zhang, B.; Shioi, S.; Tanigawa, H.; Imaizumi, S.; Miura, S.; Saku, K., FAMP, a novel apoA-I mimetic peptide, suppresses aortic plaque formation through promotion of biological HDL function in ApoE-deficient mice. *Journal of the American Heart Association* **2013**, *2*, (3), e000048. doi:10.1161/JAHA.113.000048.
404. 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*, (2), 300-7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.029.
405. 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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2010**, *334*, (2), 634-41. doi:10.1124/jpet.110.167890.
406. Chattopadhyay, A.; Navab, M.; Hough, G.; Gao, F.; Meriwether, D.; Grijalva, V.; Springstead, J. R.; Palgnachari, M. N.; Namiri-Kalantari, R.; Su, F.; Van Lenten, B. J.; Wagner, A. C.; Anantharamaiah, G. M.; Farias-Eisner, R.; Reddy, S. T.; Fogelman, A. M., A novel approach to oral apoA-I mimetic therapy. *Journal of lipid research* **2013**, *54*, (4), 995-1010. doi:10.1194/jlr.M033555.
407. Navab, M.; Hough, G.; Buga, G. M.; Su, F.; Wagner, A. C.; Meriwether, D.; Chattopadhyay, A.; Gao, F.; Grijalva, V.; Danciger, J. S.; Van Lenten, B. J.; Org, E.; Lusic, A. J.; Pan, C.; Anantharamaiah, G. M.; Farias-Eisner, R.; Smyth, S. S.; Reddy, S. T.; Fogelman, A. M., Transgenic 6F tomatoes act on the small intestine to prevent systemic inflammation and dyslipidemia caused by Western diet and intestinally derived lysophosphatidic acid. *Journal of lipid research* **2013**, *54*, (12), 3403-18. doi:10.1194/jlr.M042051.
408. 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*, (2), 395-400. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.001.
409. 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 in health and disease* **2011**, *10*, 224. doi:10.1186/1476-511X-10-224.
410. Li, X.; Chyu, K. Y.; Faria Neto, J. R.; Yano, J.; Nathwani, N.; Ferreira, C.; Dimayuga, P. C.; Cercek, B.; Kaul, S.; Shah, P. K., Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* **2004**, *110*, (12), 1701-5. doi:10.1161/01.CIR.0000142857.79401.69.
411. Van Lenten, B. J.; Wagner, A. C.; Jung, C. L.; Ruchala, P.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Watson, A. D.; Hama, S.; Navab, M.; Anantharamaiah, G. M.; Fogelman, A. M., Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *Journal of lipid research* **2008**, *49*, (11), 2302-11. doi:10.1194/jlr.M800075-JLR200.
412. Recio, C.; Maione, F.; Iqbal, A. J.; Mascolo, N.; De Feo, V., The Potential Therapeutic Application of Peptides and Peptidomimetics in Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology* **2016**, *7*, 526. doi:10.3389/fphar.2016.00526.
413. Karalis, I.; Jukema, J. W., HDL Mimetics Infusion and Regression of Atherosclerosis: Is It Still Considered a Valid Therapeutic Option? *Current cardiology reports* **2018**, *20*, (8), 66. doi:10.1007/s11886-018-1004-9.
414. 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. *Journal of lipid research* **2008**, *49*, (6), 1344-52. doi:10.1194/jlr.P800003-JLR200.
415. 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.; Schecter, A., Treatment of patients with cardiovascular disease with L-4F, an apo-A1 mimetic, did not improve select biomarkers of HDL function. *Journal of lipid research* **2011**, *52*, (2), 361-73. doi:10.1194/jlr.M011098.

416. 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. *Journal of clinical pharmacology* **2014**, *54*, (3), 301-10. doi:10.1002/jcph.194.
417. Gille, A.; Easton, R.; D'Andrea, D.; Wright, S. D.; Shear, C. L., CSL112 enhances biomarkers of reverse cholesterol transport after single and multiple infusions in healthy subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2014**, *34*, (9), 2106-14. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303720.
418. Tardif, J. C.; Ballantyne, C. M.; Barter, P.; Dasseux, J. L.; Fayad, Z. A.; Guertin, M. C.; Kastelein, J. J.; Keyserling, C.; Klepp, H.; Koenig, W.; L'Allier, P. L.; Lesperance, J.; Luscher, T. F.; Paolini, J. F.; Tawakol, A.; Waters, D. D.; Can, H. D. L. I. S. Q. A. R. I., Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *European heart journal* **2014**, *35*, (46), 3277-86. doi:10.1093/eurheartj/ehu171.
419. Kootte, R. S.; Smits, L. P.; van der Valk, F. M.; Dasseux, J. L.; Keyserling, C. H.; Barbaras, R.; Paolini, J. F.; Santos, R. D.; van Dijk, T. H.; Dallinga-van Thie, G. M.; Nederveen, A. J.; Mulder, W. M.; Hovingh, G. K.; Kastelein, J. P.; Groen, A. K.; Stroes, E., Effect of open-label infusion of an apoA-I-containing particle (CER-001) on RCT and artery wall thickness in patients with FHA. *Journal of lipid research* **2015**, *56*, (3), 703-712. doi:10.1194/jlr.M055665.
420. Nanjee, M. N.; Cooke, C. J.; Garvin, R.; Semeria, F.; Lewis, G.; Olszewski, W. L.; Miller, N. E., Intravenous apoA-I/lecithin discs increase pre-beta-HDL concentration in tissue fluid and stimulate reverse cholesterol transport in humans. *Journal of lipid research* **2001**, *42*, (10), 1586-93.
421. Keyserling, C. H.; Barbaras, R.; Benghozi, R.; Dasseux, J. L., Development of CER-001: Preclinical Dose Selection Through to Phase I Clinical Findings. *Clinical drug investigation* **2017**, *37*, (5), 483-491. doi:10.1007/s40261-017-0506-3.
422. Nanjee, M. N.; Doran, J. E.; Lerch, P. G.; Miller, N. E., Acute effects of intravenous infusion of ApoA1/phosphatidylcholine discs on plasma lipoproteins in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1999**, *19*, (4), 979-89. doi:10.1161/01.atv.19.4.979.
423. Rader, D. J., Apolipoprotein A-I Infusion Therapies for Coronary Disease: Two Outs in the Ninth Inning and Swinging for the Fences. *JAMA cardiology* **2018**, *3*, (9), 799-801. doi:10.1001/jamacardio.2018.2168.
424. Tricoci, P.; D'Andrea, D. M.; Gurbel, P. A.; Yao, Z.; Cuchel, M.; Winston, B.; Schott, R.; Weiss, R.; Blazing, M. A.; Cannon, L.; Bailey, A.; Angiolillo, D. J.; Gille, A.; Shear, C. L.; Wright, S. D.; Alexander, J. H., Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *Journal of the American Heart Association* **2015**, *4*, (8), e002171. doi:10.1161/JAHA.115.002171.
425. Michael Gibson, C.; Korjian, S.; Tricoci, P.; Daaboul, Y.; Yee, M.; Jain, P.; Alexander, J. H.; Steg, P. G.; Lincoff, A. M.; Kastelein, J. J.; Mehran, R.; D'Andrea, D. M.; Deckelbaum, L. I.; Merkely, B.; Zarebinski, M.; Ophuis, T. O.; Harrington, R. A., Safety and Tolerability of CSL112, a Reconstituted, Infusible, Plasma-Derived Apolipoprotein A-I, After Acute Myocardial Infarction: The AEGIS-I Trial (ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes I). *Circulation* **2016**, *134*, (24), 1918-1930. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025687.
426. Zheng, K. H.; van der Valk, F. M.; Smits, L. P.; Sandberg, M.; Dasseux, J. L.; Baron, R.; Barbaras, R.; Keyserling, C.; Coolen, B. F.; Nederveen, A. J.; Verberne, H. J.; Nell, T. E.; Vugts, D. J.; Duivenvoorden, R.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. M.; van Dongen, G.; Stroes, E. S. G., HDL mimetic CER-001 targets atherosclerotic plaques in patients. *Atherosclerosis* **2016**, *251*, 381-388. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.038.
427. 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*, (17), 2292-300. doi:10.1001/jama.290.17.2292.
428. Nicholls, S. J.; Tuzcu, E. M.; Sipahi, I.; Schoenhagen, P.; Crowe, T.; Kapadia, S.; Nissen, S. E., Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I Milano. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *47*, (5), 992-7. doi:10.1016/j.jacc.2005.11.040.

429. Kallend, D. G.; Reijers, J. A.; Bellibas, S. E.; Bobillier, A.; Kempen, H.; Burggraaf, J.; Moerland, M.; Wijngaard, P. L., A single infusion of MDCO-216 (ApoA-1 Milano/POPC) increases ABCA1-mediated cholesterol efflux and pre-beta 1 HDL in healthy volunteers and patients with stable coronary artery disease. *European heart journal. Cardiovascular pharmacotherapy* **2016**, *2*, (1), 23-9. doi:10.1093/ehjcvp/pvv041.
430. Kempen, H. J.; Schranz, D. B.; Asztalos, B. F.; Otvos, J.; Jeyarajah, E.; Drazul-Schrader, D.; Collins, H. L.; Adelman, S. J.; Wijngaard, P. L., Incubation of MDCO-216 (ApoA-1 Milano/POPC) with Human Serum Potentiates ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux Capacity, Generates New Prebeta-1 HDL, and Causes an Increase in HDL Size. *Journal of lipids* **2014**, *2014*, 923903. doi:10.1155/2014/923903.
431. 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 cardiology* **2018**, *3*, (9), 806-814. doi:10.1001/jamacardio.2018.2112.
432. Andrews, J.; Janssan, A.; Nguyen, T.; Pisaniello, A. D.; Scherer, D. J.; Kastelein, J. J.; Merkely, B.; Nissen, S. E.; Ray, K.; Schwartz, G. G.; Worthley, S. G.; Keyserling, C.; Dasseux, J. L.; Butters, J.; Girardi, J.; Miller, R.; Nicholls, S. J., Effect of serial infusions of reconstituted high-density lipoprotein (CER-001) on coronary atherosclerosis: rationale and design of the CARAT study. *Cardiovascular diagnosis and therapy* **2017**, *7*, (1), 45-51. doi:10.21037/cdt.2017.01.01.
433. Nicholls, S. J.; Andrews, J.; Kastelein, J. J. P.; Merkely, B.; Nissen, S. E.; Ray, K. K.; Schwartz, G. G.; Worthley, S. G.; Keyserling, C.; Dasseux, J. L.; Griffith, L.; Kim, S. W.; Janssan, A.; Di Giovanni, G.; Pisaniello, A. D.; Scherer, D. J.; Psaltis, P. J.; Butters, J., Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre-beta High-Density Lipoprotein Mimetic, on Coronary Atherosclerosis in Patients Following Acute Coronary Syndromes in the CER-001 Atherosclerosis Regression Acute Coronary Syndrome Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA cardiology* **2018**, *3*, (9), 815-822. doi:10.1001/jamacardio.2018.2121.
434. Hovingh, G. K.; Smits, L. P.; Stefanutti, C.; Soran, H.; Kwok, S.; de Graaf, J.; Gaudet, D.; Keyserling, C. H.; Klepp, H.; Frick, J.; Paolini, J. F.; Dasseux, J. L.; Kastelein, J. J.; Stroes, E. S., The effect of an apolipoprotein A-I-containing high-density lipoprotein-mimetic particle (CER-001) on carotid artery wall thickness in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: The Modifying Orphan Disease Evaluation (MODE) study. *American heart journal* **2015**, *169*, (5), 736-742 e1. doi:10.1016/j.ahj.2015.01.008.
435. Zheng, K. H.; Kaiser, Y.; van Olden, C. C.; Santos, R. D.; Dasseux, J. L.; Genest, J.; Gaudet, D.; Westerink, J.; Keyserling, C.; Verberne, H. J.; Leitersdorf, E.; Hegele, R. A.; Descamps, O. S.; Hopkins, P.; Nederveen, A. J.; Stroes, E. S. G., No benefit of HDL mimetic CER-001 on carotid atherosclerosis in patients with genetically determined very low HDL levels. *Atherosclerosis* **2020**, *311*, 13-19. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.08.004.
436. Tardif, J. C.; Gregoire, J.; L'Allier, P. L.; Ibrahim, R.; Lesperance, J.; Heinonen, T. M.; Kouz, S.; Berry, C.; Basser, R.; Lavoie, M. A.; Guertin, M. C.; Rodes-Cabau, J.; Effect of r, H. D. L. o. A.-S.; Efficacy, I., Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *Jama* **2007**, *297*, (15), 1675-82. doi:10.1001/jama.297.15.jpc70004.
437. Chenevard, R.; Hurlimann, D.; Spieker, L.; Bechir, M.; Enseleit, F.; Hermann, M.; Flammer, A. J.; Sudano, I.; Corti, R.; Luscher, T. F.; Noll, G.; Ruschitzka, F., Reconstituted HDL in acute coronary syndromes. *Cardiovascular therapeutics* **2012**, *30*, (2), e51-7. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00221.x.
438. Gille, A.; D'Andrea, D.; Tortorici, M. A.; Hartel, G.; Wright, S. D., CSL112 (Apolipoprotein A-I [Human]) Enhances Cholesterol Efflux Similarly in Healthy Individuals and Stable Atherosclerotic Disease Patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2018**, *38*, (4), 953-963. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310538.
439. Gibson, C. M.; Kerneis, M.; Yee, M. K.; Daaboul, Y.; Korjian, S.; Mehr, A. P.; Tricoli, P.; Alexander, J. H.; Kastelein, J. J. P.; Mehran, R.; Bode, C.; Lewis, B. S.; Mehta, R.; Duffy, D.; Feaster, J.; Halabi, M.; Angiolillo, D. J.; Duerschmied, D.; Ophuis, T. O.; Merkely, B., The CSL112-2001 trial: Safety and tolerability of multiple doses of CSL112 (apolipoprotein A-I

- [human]), an intravenous formulation of plasma-derived apolipoprotein A-I, among subjects with moderate renal impairment after acute myocardial infarction. *American heart journal* **2019**, 208, 81-90. doi:10.1016/j.ahj.2018.11.008.
440. Keene, D.; Price, C.; Shun-Shin, M. J.; Francis, D. P., Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *Bmj* **2014**, 349, g4379. doi:10.1136/bmj.g4379.
441. White, C. R.; Garber, D. W.; Anantharamaiah, G. M., Anti-inflammatory and cholesterol-reducing properties of apolipoprotein mimetics: a review. *Journal of lipid research* **2014**, 55, (10), 2007-21. doi:10.1194/jlr.R051367.
442. Garber, D. W.; Handattu, S.; Aslan, I.; Datta, G.; Chaddha, M.; Anantharamaiah, G. M., Effect of an arginine-rich amphipathic helical peptide on plasma cholesterol in dyslipidemic mice. *Atherosclerosis* **2003**, 168, (2), 229-37. doi:10.1016/s0021-9150(03)00101-1.
443. Gupta, H.; White, C. R.; Handattu, S.; Garber, D. W.; Datta, G.; Chaddha, M.; Dai, L.; Gianturco, S. H.; Bradley, W. A.; Anantharamaiah, G. M., Apolipoprotein E mimetic Peptide dramatically lowers plasma cholesterol and restores endothelial function in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* **2005**, 111, (23), 3112-8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.497107.
444. Handattu, S. P.; Nayyar, G.; Garber, D. W.; Palgunachari, M. N.; Monroe, C. E.; Keenum, T. D.; Mishra, V. K.; Datta, G.; Anantharamaiah, G. M., Two apolipoprotein E mimetic peptides with similar cholesterol reducing properties exhibit differential atheroprotective effects in LDL-R null mice. *Atherosclerosis* **2013**, 227, (1), 58-64. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.064.
445. Sharifov, O. F.; Nayyar, G.; Ternovoy, V. V.; Mishra, V. K.; Litovsky, S. H.; Palgunachari, M. N.; Garber, D. W.; Anantharamaiah, G. M.; Gupta, H., Cationic peptide mR18L with lipid lowering properties inhibits LPS-induced systemic and liver inflammation in rats. *Biochemical and biophysical research communications* **2013**, 436, (4), 705-10. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.020.
446. White, C. R.; Goldberg, D. I.; Anantharamaiah, G. M., Recent developments in modulating atherogenic lipoproteins. *Current opinion in lipidology* **2015**, 26, (5), 369-75. doi:10.1097/MOL.0000000000000216.
447. Anantharamaiah, G. M.; Garber, D. W.; Goldberg, D.; Morrel, E.; Datta, G.; Palgunachari, M. N.; Register, T. C.; Appt, S. E.; White, C. R., Novel fatty acyl apoE mimetic peptides have increased potency to reduce plasma cholesterol in mice and macaques. *Journal of lipid research* **2018**, 59, (11), 2075-2083. doi:10.1194/jlr.M085985.
448. Giordano-Mooga, S.; Datta, G.; Wolkowicz, P.; Garber, D. W.; Palgunachari, M.; White, C. R.; Anantharamaiah, G. M., The Apolipoprotein E Mimetic Peptide AEM-2 Attenuates Mitochondrial Injury And Apoptosis In Human THP-1 Macrophages. *Current topics in peptide & protein research* **2018**, 19, 15-25.
449. Bielicki, J. K.; Zhang, H.; Cortez, Y.; Zheng, Y.; Narayanaswami, V.; Patel, A.; Johansson, J.; Azhar, S., A new HDL mimetic peptide that stimulates cellular cholesterol efflux with high efficiency greatly reduces atherosclerosis in mice. *Journal of lipid research* **2010**, 51, (6), 1496-503. doi:10.1194/jlr.M003665.
450. Hafiane, A.; Bielicki, J. K.; Johansson, J. O.; Genest, J., Apolipoprotein E derived HDL mimetic peptide ATI-5261 promotes nascent HDL formation and reverse cholesterol transport in vitro. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, 1842, (10), 1498-512. doi:10.1016/j.bbali.2014.07.018.
451. Hafiane, A.; Bielicki, J. K.; Johansson, J. O.; Genest, J., Novel Apo E-Derived ABCA1 Agonist Peptide (CS-6253) Promotes Reverse Cholesterol Transport and Induces Formation of prebeta-1 HDL In Vitro. *PLoS one* **2015**, 10, (7), e0131997. doi:10.1371/journal.pone.0131997.
452. Zhao, W.; Du, F.; Zhang, M.; Sun, S.; Yu, H.; Fan, D., A new recombinant human apolipoprotein E mimetic peptide with high-density lipoprotein binding and function enhancing activity. *Experimental biology and medicine* **2011**, 236, (12), 1468-76. doi:10.1258/ebm.2011.011169.
453. Datta, G.; White, C. R.; Dashti, N.; Chaddha, M.; Palgunachari, M. N.; Gupta, H.; Handattu, S. P.; Garber, D. W.; Anantharamaiah, G. M., Anti-inflammatory and recycling properties of an apolipoprotein mimetic peptide, Ac-hE18A-NH(2). *Atherosclerosis* **2010**, 208, (1), 134-41. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.019.

454. Xu, Y.; Liu, H.; Liu, M.; Li, F.; Liu, L.; Du, F.; Fan, D.; Yu, H., A human apolipoprotein E mimetic peptide reduces atherosclerosis in aged apolipoprotein E null mice. *American journal of translational research* **2016**, *8*, (8), 3482-92.
455. Sharifov, O. F.; Nayyar, G.; Ternovoy, V. V.; Palgunachari, M. N.; Garber, D. W.; Anantharamaiah, G.; Gupta, H., Comparison of anti-endotoxin activity of apoE and apoA mimetic derivatives of a model amphipathic peptide 18A. *Innate immunity* **2014**, *20*, (8), 867-80. doi:10.1177/1753425913514621.
456. Nayyar, G.; Garber, D. W.; Palgunachari, M. N.; Monroe, C. E.; Keenum, T. D.; Handattu, S. P.; Mishra, V. K.; Anantharamaiah, G. M., Apolipoprotein E mimetic is more effective than apolipoprotein A-I mimetic in reducing lesion formation in older female apo E null mice. *Atherosclerosis* **2012**, *224*, (2), 326-31. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.040.
457. He, T. C.; Zhou, S.; da Costa, L. T.; Yu, J.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B., A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, (5), 2509-14. doi:10.1073/pnas.95.5.2509.
458. Luo, J.; Deng, Z. L.; Luo, X.; Tang, N.; Song, W. X.; Chen, J.; Sharff, K. A.; Luu, H. H.; Haydon, R. C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; He, T. C., A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature protocols* **2007**, *2*, (5), 1236-47. doi:10.1038/nprot.2007.135.
459. Fallaux, F. J.; Kranenburg, O.; Cramer, S. J.; Houweling, A.; Van Ormondt, H.; Hoeben, R. C.; Van Der Eb, A. J., Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Human gene therapy* **1996**, *7*, (2), 215-22. doi:10.1089/hum.1996.7.2-215.
460. Kypreos, K. E.; van Dijk, K. W.; van Der Zee, A.; Havekes, L. M.; Zannis, V. I., Domains of apolipoprotein E contributing to triglyceride and cholesterol homeostasis in vivo. Carboxyl-terminal region 203-299 promotes hepatic very low density lipoprotein-triglyceride secretion. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, (23), 19778-86. doi:10.1074/jbc.M100418200.
461. Matz, C. E.; Jonas, A., Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *The Journal of biological chemistry* **1982**, *257*, (8), 4535-40.
462. 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. *Journal of lipid research* **2013**, *54*, (1), 164-76. doi:10.1194/jlr.M030965.
463. Argyri, L.; Skamnaki, V.; Stratikos, E.; Chroni, A., A simple approach for human recombinant apolipoprotein E4 expression and purification. *Protein expression and purification* **2011**, *79*, (2), 251-7. doi:10.1016/j.pep.2011.06.011.
464. Hochuli E, D. H., Schacher A, New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **1987**, *411*, 177-84.
465. Robinson, M. D.; Speed, T. P., A comparison of Affymetrix gene expression arrays. *BMC bioinformatics* **2007**, *8*, 449. doi:10.1186/1471-2105-8-449.
466. Irizarry, R. A.; Hobbs, B.; Collin, F.; Beazer-Barclay, Y. D.; Antonellis, K. J.; Scherf, U.; Speed, T. P., Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **2003**, *4*, (2), 249-64. doi:10.1093/biostatistics/4.2.249.
467. Ching, T.; Huang, S.; Garmire, L. X., Power analysis and sample size estimation for RNA-Seq differential expression. *Rna* **2014**, *20*, (11), 1684-96. doi:10.1261/rna.046011.114.
468. Ringner, M., What is principal component analysis? *Nature biotechnology* **2008**, *26*, (3), 303-4. doi:10.1038/nbt0308-303.
469. Guess, M. J.; Wilson, S. B., Introduction to hierarchical clustering. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* **2002**, *19*, (2), 144-51. doi:10.1097/00004691-200203000-00005.
470. Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M.; Davis, A. P.; Dolinski, K.; Dwight, S. S.; Eppig, J. T.; Harris, M. A.; Hill, D. P.; Issel-Tarver, L.; Kasarskis, A.; Lewis, S.; Matese, J. C.; Richardson, J. E.; Ringwald, M.; Rubin, G. M.; Sherlock, G., Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **2000**, *25*, (1), 25-9. doi:10.1038/75556.

471. Tabas-Madrid, D.; Nogales-Cadenas, R.; Pascual-Montano, A., GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research* **2012**, *40*, (Web Server issue), W478-83. doi:10.1093/nar/gks402.
472. Carmona-Saez, P.; Chagoyen, M.; Tirado, F.; Carazo, J. M.; Pascual-Montano, A., GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology* **2007**, *8*, (1), R3. doi:10.1186/gb-2007-8-1-r3.
473. Nogales-Cadenas, R.; Carmona-Saez, P.; Vazquez, M.; Vicente, C.; Yang, X.; Tirado, F.; Carazo, J. M.; Pascual-Montano, A., GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic acids research* **2009**, *37*, (Web Server issue), W317-22. doi:10.1093/nar/gkp416.
474. Kramer, A.; Green, J.; Pollard, J., Jr.; Tugendreich, S., Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* **2014**, *30*, (4), 523-30. doi:10.1093/bioinformatics/btt703.
475. Schmittgen, T. D.; Livak, K. J., Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **2008**, *3*, (6), 1101-8. doi:10.1038/nprot.2008.73.
476. Jonkman, J. E.; Cathcart, J. A.; Xu, F.; Bartolini, M. E.; Amon, J. E.; Stevens, K. M.; Colarusso, P., An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion & migration* **2014**, *8*, (5), 440-51. doi:10.4161/cam.36224.
477. Davis, P. K.; Ho, A.; Dowdy, S. F., Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *BioTechniques* **2001**, *30*, (6), 1322-6, 1328, 1330-1. doi:10.2144/01306rv01.
478. Morales-Ruiz, M.; Fulton, D.; Sowa, G.; Languino, L. R.; Fujio, Y.; Walsh, K.; Sessa, W. C., Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circulation research* **2000**, *86*, (8), 892-6. doi:10.1161/01.res.86.8.892.
479. Kanno, S.; Oda, N.; Abe, M.; Terai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Tabayashi, K.; Shibuya, M.; Sato, Y., Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* **2000**, *19*, (17), 2138-46. doi:10.1038/sj.onc.1203533.
480. Morey, J. S.; Ryan, J. C.; Van Dolah, F. M., Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological procedures online* **2006**, *8*, 175-93. doi:10.1251/bpo126.
481. Dallas, P. B.; Gottardo, N. G.; Firth, M. J.; Beesley, A. H.; Hoffmann, K.; Terry, P. A.; Freitas, J. R.; Boag, J. M.; Cummings, A. J.; Kees, U. R., Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC genomics* **2005**, *6*, 59. doi:10.1186/1471-2164-6-59.
482. Ding, Y.; Xu, L.; Jovanovic, B. D.; Helenowski, I. B.; Kelly, D. L.; Catalona, W. J.; Yang, X. J.; Pins, M.; Bergan, R. C., The methodology used to measure differential gene expression affects the outcome. *Journal of biomolecular techniques : JBT* **2007**, *18*, (5), 321-30.
483. Golan, S.; Entin-Meer, M.; Semo, Y.; Maysel-Auslender, S.; Mezaad-Koursh, D.; Keren, G.; Loewenstein, A.; Barak, A., Gene profiling of human VEGF signaling pathways in human endothelial and retinal pigment epithelial cells after anti VEGF treatment. *BMC research notes* **2014**, *7*, 617. doi:10.1186/1756-0500-7-617.
484. Yamanda, S.; Ebihara, S.; Asada, M.; Okazaki, T.; Niu, K.; Ebihara, T.; Koyanagi, A.; Yamaguchi, N.; Yagita, H.; Arai, H., Role of ephrinB2 in nonproductive angiogenesis induced by Delta-like 4 blockade. *Blood* **2009**, *113*, (15), 3631-9. doi:10.1182/blood-2008-07-170381.
485. Raikwar, N. S.; Liu, K. Z.; Thomas, C. P., Protein kinase C regulates FLT1 abundance and stimulates its cleavage in vascular endothelial cells with the release of a soluble PIGF/VEGF antagonist. *Experimental cell research* **2013**, *319*, (17), 2578-87. doi:10.1016/j.yexcr.2013.07.005.
486. Song, X.; Liu, S.; Qu, X.; Hu, Y.; Zhang, X.; Wang, T.; Wei, F., BMP2 and VEGF promote angiogenesis but retard terminal differentiation of osteoblasts in bone regeneration by up-regulating Id1. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2011**, *43*, (10), 796-804. doi:10.1093/abbs/gmr074.
487. Munoz-Chapuli, R.; Quesada, A. R.; Angel Medina, M., Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2004**, *61*, (17), 2224-43. doi:10.1007/s00018-004-4070-7.
488. Lamalice, L.; Le Boeuf, F.; Huot, J., Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation research* **2007**, *100*, (6), 782-94. doi:10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e.

489. Santos, E.; Crespo, P., The RAS-ERK pathway: A route for couples. *Science signaling* **2018**, *11*, (554), doi:10.1126/scisignal.aav0917.
490. Hemmings, B. A.; Restuccia, D. F., PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2012**, *4*, (9), a011189. doi:10.1101/cshperspect.a011189.
491. Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R.; Zeiher, A. M., Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **1999**, *399*, (6736), 601-5. doi:10.1038/21224.
492. Li, C.; Hu, Y.; Sturm, G.; Wick, G.; Xu, Q., Ras/Rac-Dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells stimulated by cyclic strain stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2000**, *20*, (3), E1-9. doi:10.1161/01.atv.20.3.e1.
493. Varon, C.; Rottiers, P.; Ezan, J.; Reuzeau, E.; Basoni, C.; Kramer, I.; Genot, E., TGFbeta1 regulates endothelial cell spreading and hypertrophy through a Rac-p38-mediated pathway. *Biology of the cell* **2008**, *100*, (9), 537-50. doi:10.1042/BC20080021.
494. Fukata, M.; Nakagawa, M.; Kaibuchi, K., Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Current opinion in cell biology* **2003**, *15*, (5), 590-7. doi:10.1016/s0955-0674(03)00097-8.
495. Kim, A. L.; Labasi, J. M.; Zhu, Y.; Tang, X.; McClure, K.; Gabel, C. A.; Athar, M.; Bickers, D. R., Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *The Journal of investigative dermatology* **2005**, *124*, (6), 1318-25. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23747.x.
496. Ghimire, K.; Zaric, J.; Alday-Parejo, B.; Seebach, J.; Bousquenaud, M.; Stalin, J.; Bieler, G.; Schnittler, H. J.; Ruegg, C., MAG11 Mediates eNOS Activation and NO Production in Endothelial Cells in Response to Fluid Shear Stress. *Cells* **2019**, *8*, (5), doi:10.3390/cells8050388.
497. Wang, H.; Yu, Y.; Guo, R. W.; Shi, Y. K.; Song, M. B.; Chen, J. F.; Yu, S. Y.; Yin, Y. G.; Gao, P.; Huang, L., Inhibitor of DNA binding-1 promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells in vitro. *Molecular and cellular biochemistry* **2010**, *335*, (1-2), 19-27. doi:10.1007/s11010-009-0236-9.
498. Yu, Y.; Liang, Y.; Liu, X.; Yang, H.; Su, Y.; Xia, X.; Wang, H., Id1 modulates endothelial progenitor cells function through relieving the E2-2-mediated repression of FGFR1 and VEGFR2 in vitro. *Molecular and cellular biochemistry* **2016**, *411*, (1-2), 289-98. doi:10.1007/s11010-015-2591-z.
499. Su, Y.; Gao, L.; Teng, L.; Wang, Y.; Cui, J.; Peng, S.; Fu, S., Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NF-kappaB/MMP-2 signaling pathways. *Journal of translational medicine* **2013**, *11*, 132. doi:10.1186/1479-5876-11-132.
500. Steinle, J. J.; Meininger, C. J.; Chowdhury, U.; Wu, G.; Granger, H. J., Role of ephrin B2 in human retinal endothelial cell proliferation and migration. *Cellular signalling* **2003**, *15*, (11), 1011-7. doi:10.1016/s0898-6568(03)00072-x.
501. Steinle, J. J.; Meininger, C. J.; Forough, R.; Wu, G.; Wu, M. H.; Granger, H. J., Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, (46), 43830-5. doi:10.1074/jbc.M207221200.
502. Bochenek, M. L.; Dickinson, S.; Astin, J. W.; Adams, R. H.; Nobes, C. D., Ephrin-B2 regulates endothelial cell morphology and motility independently of Eph-receptor binding. *Journal of cell science* **2010**, *123*, (Pt 8), 1235-46. doi:10.1242/jcs.061903.
503. Dennstedt, E.; Bryan, B., siRNA knockdown of gene expression in endothelial cells. *Methods in molecular biology* **2011**, *764*, 215-22. doi:10.1007/978-1-61779-188-8_14.
504. Zumbansen, M.; Altrogge, L. M.; Spottke, N. U.; Spicker, S.; Offizier, S. M.; Domzalski, S. B.; St Amand, A. L.; Toell, A.; Leake, D.; Mueller-Hartmann, H. A., First siRNA library screening in hard-to-transfect HUVEC cells. *Journal of RNAi and gene silencing : an international journal of RNA and gene targeting research* **2009**, *6*, (1), 354-60.
505. Ling, M. T.; Wang, X.; Ouyang, X. S.; Lee, T. K.; Fan, T. Y.; Xu, K.; Tsao, S. W.; Wong, Y. C., Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* **2002**, *21*, (55), 8498-505. doi:10.1038/sj.onc.1206007.

506. Valanti, E. K.; Dalakoura-Karagkouni, K.; Sanoudou, D., Current and Emerging Reconstituted HDL-apoA-I and HDL-apoE Approaches to Treat Atherosclerosis. *Journal of personalized medicine* **2018**, *8*, (4), doi:10.3390/jpm8040034.
507. Davignon, J., Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2005**, *25*, (2), 267-9. doi:10.1161/01.ATV.0000154570.50696.2c.
508. Li, H.; Reddick, R. L.; Maeda, N., Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* **1993**, *13*, (12), 1814-21. doi:10.1161/01.atv.13.12.1814.
509. Siragusa, M.; Katare, R.; Meloni, M.; Damilano, F.; Hirsch, E.; Emanuelli, C.; Madeddu, P., Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in angiogenesis and healing of experimental myocardial infarction in mice. *Circulation research* **2010**, *106*, (4), 757-68. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.207449.
510. Heller, R.; Chang, Q.; Ehrlich, G.; Hsieh, S. N.; Schoenwaelder, S. M.; Kuhlencordt, P. J.; Preissner, K. T.; Hirsch, E.; Wetzker, R., Overlapping and distinct roles for PI3Kbeta and gamma isoforms in S1P-induced migration of human and mouse endothelial cells. *Cardiovascular research* **2008**, *80*, (1), 96-105. doi:10.1093/cvr/cvn159.
511. Nishiyama, K.; Takaji, K.; Kataoka, K.; Kurihara, Y.; Yoshimura, M.; Kato, A.; Ogawa, H.; Kurihara, H., Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis. *Circulation* **2005**, *112*, (18), 2840-50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516898.
512. Wang, F.; Yamauchi, M.; Muramatsu, M.; Osawa, T.; Tsuchida, R.; Shibuya, M., RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, (11), 9097-106. doi:10.1074/jbc.M110.165605.
513. Madeddu, P.; Kraenkel, N.; Barcelos, L. S.; Siragusa, M.; Campagnolo, P.; Oikawa, A.; Caporali, A.; Herman, A.; Azzolino, O.; Barberis, L.; Perino, A.; Damilano, F.; Emanuelli, C.; Hirsch, E., Phosphoinositide 3-kinase gamma gene knockout impairs postischemic neovascularization and endothelial progenitor cell functions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2008**, *28*, (1), 68-76. doi:10.1161/ATVBAHA.107.145573.
514. Wang, M.; Collins, M. J.; Foster, T. R.; Bai, H.; Hashimoto, T.; Santana, J. M.; Shu, C.; Dardik, A., Eph-B4 mediates vein graft adaptation by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of vascular surgery* **2017**, *65*, (1), 179-189. doi:10.1016/j.jvs.2015.11.041.
515. Sakurai, D.; Tsuchiya, N.; Yamaguchi, A.; Okaji, Y.; Tsuno, N. H.; Kobata, T.; Takahashi, K.; Tokunaga, K., Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *Journal of immunology* **2004**, *173*, (9), 5801-9. doi:10.4049/jimmunol.173.9.5801.
516. Huang, C.; Jacobson, K.; Schaller, M. D., MAP kinases and cell migration. *Journal of cell science* **2004**, *117*, (Pt 20), 4619-28. doi:10.1242/jcs.01481.
517. Fulton, D.; Gratton, J. P.; McCabe, T. J.; Fontana, J.; Fujio, Y.; Walsh, K.; Franke, T. F.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W. C., Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **1999**, *399*, (6736), 597-601. doi:10.1038/21218.
518. Donnini, S.; Ziche, M., Constitutive and inducible nitric oxide synthase: role in angiogenesis. *Antioxidants & redox signaling* **2002**, *4*, (5), 817-23. doi:10.1089/152308602760598972.
519. Murohara, T.; Witzenbichler, B.; Spyridopoulos, I.; Asahara, T.; Ding, B.; Sullivan, A.; Losordo, D. W.; Isner, J. M., Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1999**, *19*, (5), 1156-61. doi:10.1161/01.atv.19.5.1156.
520. Rousseau, S.; Houle, F.; Landry, J.; Huot, J., p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **1997**, *15*, (18), 2169-77. doi:10.1038/sj.onc.1201380.
521. Boo, Y. C.; Sorescu, G.; Boyd, N.; Shiojima, I.; Walsh, K.; Du, J.; Jo, H., Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, (5), 3388-96. doi:10.1074/jbc.M108789200.
522. Butt, E.; Bernhardt, M.; Smolenski, A.; Kotsonis, P.; Frohlich, L. G.; Sickmann, A.; Meyer, H. E.; Lohmann, S. M.; Schmidt, H. H., Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein

- kinases. *The Journal of biological chemistry* **2000**, 275, (7), 5179-87. doi:10.1074/jbc.275.7.5179.
523. Michell, B. J.; Chen, Z.; Tiganis, T.; Stapleton, D.; Katsis, F.; Power, D. A.; Sim, A. T.; Kemp, B. E., Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **2001**, 276, (21), 17625-8. doi:10.1074/jbc.C100122200.
524. Chen, Z. P.; Mitchelhill, K. I.; Michell, B. J.; Stapleton, D.; Rodriguez-Crespo, I.; Witters, L. A.; Power, D. A.; Ortiz de Montellano, P. R.; Kemp, B. E., AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS letters* **1999**, 443, (3), 285-9. doi:10.1016/s0014-5793(98)01705-0.
525. Shaul, P. W., Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annual review of physiology* **2002**, 64, 749-74. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.155952.
526. Li, W.; Wang, H.; Kuang, C. Y.; Zhu, J. K.; Yu, Y.; Qin, Z. X.; Liu, J.; Huang, L., An essential role for the Id1/PI3K/Akt/NFkB/survivin signalling pathway in promoting the proliferation of endothelial progenitor cells in vitro. *Molecular and cellular biochemistry* **2012**, 363, (1-2), 135-45. doi:10.1007/s11010-011-1166-x.
527. Su, Y.; Zheng, L.; Wang, Q.; Bao, J.; Cai, Z.; Liu, A., The PI3K/Akt pathway upregulates Id1 and integrin alpha4 to enhance recruitment of human ovarian cancer endothelial progenitor cells. *BMC cancer* **2010**, 10, 459. doi:10.1186/1471-2407-10-459.
528. Di, K.; Wong, Y. C.; Wang, X., Id-1 promotes TGF-beta1-induced cell motility through HSP27 activation and disassembly of adherens junction in prostate epithelial cells. *Experimental cell research* **2007**, 313, (19), 3983-99. doi:10.1016/j.yexcr.2007.08.023.
529. Li, W.; Du, D.; Li, Y., Id-1 Promotes Reendothelialization In The Early Phase After Vascular Injury Through Activation Of NFkB/survivin Signaling Pathway. *Drug design, development and therapy* **2019**, 13, 3799-3811. doi:10.2147/DDDT.S208707.
530. Zhang, H.; Lawson, W. E.; Polosukhin, V. V.; Pozzi, A.; Blackwell, T. S.; Litingtung, Y.; Chiang, C., Inhibitor of differentiation 1 promotes endothelial survival in a bleomycin model of lung injury in mice. *The American journal of pathology* **2007**, 171, (4), 1113-26. doi:10.2353/ajpath.2007.070226.
531. Meyrelles, S. S.; Peotta, V. A.; Pereira, T. M.; Vasquez, E. C., Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in health and disease* **2011**, 10, 211. doi:10.1186/1476-511X-10-211.
532. Valanti, E. K.; Dalakoura-Karagkouni, K.; Fotakis, P.; Vafiadaki, E.; Mantzoros, C. S.; Chroni, A.; Zannis, V.; Kardassis, D.; Sanoudou, D., Reconstituted HDL-apoE3 promotes endothelial cell migration through ID1 and its downstream kinases ERK1/2, AKT and p38 MAPK. *Metabolism: clinical and experimental* **2022**, 127, 154954. doi:10.1016/j.metabol.2021.154954.
533. Radu, M.; Chernoff, J., An in vivo assay to test blood vessel permeability. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2013**, (73), e50062. doi:10.3791/50062.
534. Bommel, H.; Kleefeldt, F.; Zernecke, A.; Ghavampour, S.; Wagner, N.; Kuerten, S.; Ergun, S., Visualization of endothelial barrier damage prior to formation of atherosclerotic plaques. *Histochemistry and cell biology* **2017**, 148, (2), 117-127. doi:10.1007/s00418-017-1562-8.
535. Evans, C. E.; Iruela-Arispe, M. L.; Zhao, Y. Y., Mechanisms of Endothelial Regeneration and Vascular Repair and Their Application to Regenerative Medicine. *The American journal of pathology* **2021**, 191, (1), 52-65. doi:10.1016/j.ajpath.2020.10.001.
536. Zhao, Z.; Bo, Z.; Gong, W.; Guo, Y., Inhibitor of Differentiation 1 (Id1) in Cancer and Cancer Therapy. *International journal of medical sciences* **2020**, 17, (8), 995-1005. doi:10.7150/ijms.42805.
537. Nakao, T.; Shiota, M.; Tatemoto, Y.; Izumi, Y.; Iwao, H., Pravastatin induces rat aortic endothelial cell proliferation and migration via activation of PI3K/Akt/mTOR/p70 S6 kinase signaling. *Journal of pharmacological sciences* **2007**, 105, (4), 334-41. doi:10.1254/jphs.fp0070682.
538. Safaeian, L.; Vaseghi, G.; Jabari, H.; Dana, N., Evolocumab, a proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor, promotes angiogenesis in vitro. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **2019**, 97, (5), 352-358. doi:10.1139/cjpp-2018-0542.
539. Yang, N.; Yao, S.; Wang, M.; Jiao, P.; Zhang, Y.; Qin, S., Apolipoprotein A-I mimetic peptide reverse D-4F improves the biological functions of mouse bone marrow-derived late EPCs via

- PI3K/AKT/eNOS pathway. *Molecular and cellular biochemistry* **2013**, 377, (1-2), 229-36. doi:10.1007/s11010-013-1592-z.
540. Lee, C. H.; Chang, S. H.; Lin, Y. H.; Liu, S. J.; Wang, C. J.; Hsu, M. Y.; Hung, K. C.; Yeh, Y. H.; Chen, W. J.; Hsieh, I. C.; Wen, M. S., Acceleration of re-endothelialization and inhibition of neointimal formation using hybrid biodegradable nanofibrous rosuvastatin-loaded stents. *Biomaterials* **2014**, 35, (15), 4417-27. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.017.
541. Honda, K.; Matoba, T.; Antoku, Y.; Koga, J. I.; Ichi, I.; Nakano, K.; Tsutsui, H.; Egashira, K., Lipid-Lowering Therapy With Ezetimibe Decreases Spontaneous Atherothrombotic Occlusions in a Rabbit Model of Plaque Erosion: A Role of Serum Oxysterols. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2018**, 38, (4), 757-771. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310244.
542. Liu, D.; Ding, Z.; Wu, M.; Xu, W.; Qian, M.; Du, Q.; Zhang, L.; Cui, Y.; Zheng, J.; Chang, H.; Huang, C.; Lin, D.; Wang, Y., The apolipoprotein A-I mimetic peptide, D-4F, alleviates ox-LDL-induced oxidative stress and promotes endothelial repair through the eNOS/HO-1 pathway. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2017**, 105, 77-88. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.01.017.
543. Schmidt-Lucke, C.; Fichtlscherer, S.; Rossig, L.; Kamper, U.; Dimmeler, S., Improvement of endothelial damage and regeneration indexes in patients with coronary artery disease after 4 weeks of statin therapy. *Atherosclerosis* **2010**, 211, (1), 249-54. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.007.
544. Itzhaki Ben Zadok, O.; Mager, A.; Leshem-Lev, D.; Lev, E.; Kornowski, R.; Eisen, A., The Effect of Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Inhibitors on Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Cardiovascular Disease. *Cardiovascular drugs and therapy* **2022**, 36, (1), 85-92. doi:10.1007/s10557-020-07119-1.