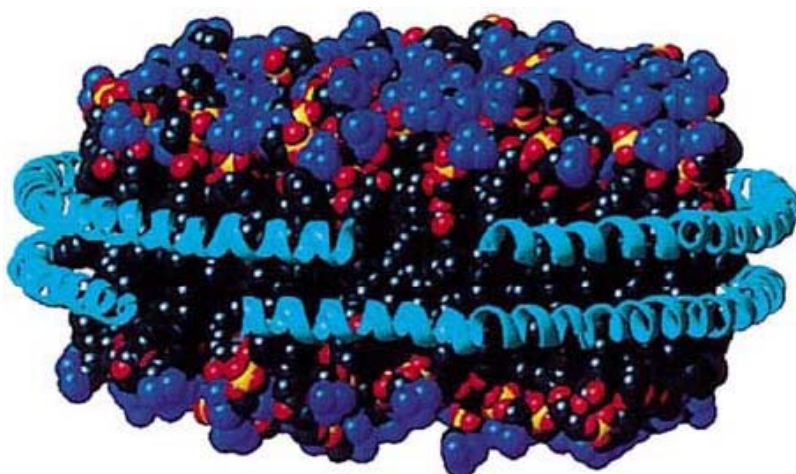


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα: Μοριακή Βιολογία και Βιοϊατρική
Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης:

Δημιουργία ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν τις
απολιποπρωτεΐνες A-IV και A-II



Επιμέλεια εργασίας: Καλλιόπη Τζαβλάκη

Υπεύθυνος καθηγητής: Δημήτρης Καρδάσης

Ιανουάριος 2009
Ηράκλειο Κρήτης

*...Θέλω με πολλά πράγματα να κουβεντιάσω
και δε θα φύγω απ' αυτό τον κόσμο
δίχως να μάθω γιατί ήρθα,
δίχως να καταλάβω αυτό το θέμα,
και δε με φτάνουν πια τα πρόσωπα,
ακόμα μακρύτερα πρέπει να πάω,
ακόμα πιο κοντά πρέπει να 'ρθώ...*

Pablo Neruda

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν ουσιαστική η συμβολή αρκετών ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα πραγματικά να ευχαριστήσω. Καθένας με βοήθησε με το δικό του τρόπο και πρέπει να πω πως χωρίς τη βοήθεια και τη στήριξη που μου προσέφεραν το αποτέλεσμα δεν θα ήταν το ίδιο μια και η χρονιά που πέρασε ήταν δύσκολη για μένα σε προσωπικό επίπεδο.

Πρώτο απ' όλους θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Δημήτρη Καρδάση για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω για ένα χρόνο μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Τον ευχαριστώ όχι μόνο για την άμογη καθοδήγηση, τη βοήθεια και τις γνώσεις του αλλά και για την κατανόηση και τη στήριξη που μου πρόσφερε όποτε το είχα ανάγκη. Τον ευχαριστώ γιατί μου έδειξε πως ένας καλός επιστήμονας μπορεί να είναι και καλός δάσκαλος, μα πάνω απ' όλα Άνθρωπος.

Θέλω να ευχαριστήσω την Ελευθερία Βασιλάκη για την καθοδήγηση στο ξεκίνημά μου, τη βοήθεια που μου πρόσφερε όποτε χρειαζόμουν. Την ευχαριστώ για το χιούμορ της, τις ατέλειωτες συζητήσεις μας και τις συμβουλές της για οτιδήποτε με απασχολούσε.

Ευχαριστώ την Έφη Θυμιάκου για την υπομονή της με τις ατέλειωτες απορίες μου, για την προθυμία της να με βοηθήσει και να με καθοδηγήσει όποτε το χρειαζόμουν. Την ευχαριστώ για τα πειράγματά της που με έκαναν να γελάω και να ξεχνάω ό,τι με προβλημάτιζε.

Ευχαριστώ τη Βέτα για τις συμβουλές και την άμογη συνεργασία.

Θέλω να ευχαριστήσω τη Γιάννα, τη Σόφη, τη Ναντίνα και τον Παναγιώτη για τη συνεργασία και τη θετική ενέργεια.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδερφή μου για τη στήριξη, την αγάπη τους, την κατανόηση που δείχνουν στις αποφάσεις μου όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Raffuello μου, που μπήκε στη ζωή μου ξαφνικά και την έκανε πιο φωτεινή, πιο αισιόδοξη, πιο χαρούμενη. Που με έμαθε να δίνω σημασία και να εκτιμώ τις μικρές χαρές της ζωής.

Θέλω να αφιερώσω τη διατριβή αυτή στον παππού Μενέλαο και στη γιαγιά Ιωάννα που μας άφησαν τόσο ξαφνικά. Γιατί με μεγάλωσαν με αγάπη και με έμαθαν την αξία του να είσαι πάνω από όλα άνθρωπος.

Κάλλια Τζαβλάκη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
ΟΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ.....	11
ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΗΣ HDL.....	13
Η ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ HDL ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ... 14	
Χαρακτηριστικά της αθηρωμάτωσης.....	14
Το μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης.....	15
Η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση της HDL.....	16
Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	17
Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-IV.....	17
Το γονίδιο της apoA-IV.....	17
Η απολιποπρωτεΐνη A-IV.....	17
Η δράση της απολιποπρωτεΐνης A-IV.....	18
Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-II.....	20
Το γονίδιο της apoA-II.....	20
Η απολιποπρωτεΐνη A-II.....	20
Η δράση της απολιποπρωτεΐνης A-II.....	20
Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-I.....	21
Το γονίδιο της apoA-I.....	21
Η απολιποπρωτεΐνη A-I.....	22
Η δράση της απολιποπρωτεΐνης A-I.....	22
ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΣΗ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	23
Χαρακτηριστικά της βιοτίνης.....	23
Η λιγάση της βιοτίνης BirA.....	24
<i>In vitro</i> βιοτινυλίωση πρωτεϊνών.....	25
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	26
ΥΛΙΚΑ	27
Δημιουργία πλασμιαδικών κατασκευών.....	27
Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών.....	28

Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	28
RNA extraction & RT-PCR.....	28
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την απομόνωση των γονιδίων για τις απολιποπρωτεΐνες A-IV και A-II και την απομόνωση της γενωμικής αλληλουχίας της απολιποπρωτεΐνης A-I μέχρι το κωδικόνιο λήξης.....	29
Αντίδραση σχηματισμού δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.....	32
Αντίδραση φωσφορυλίωσης δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.....	32
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	32
Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	33
Αντιδράσεις σύνδεσης (ligation reactions).....	33
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> DH10β (transformation).....	34
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (Πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης)	34
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.....	35
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Western blot).....	36
Κυτταροκαλλιέργειες.....	37
Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections).....	38
Συλλογή κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνικών δειγμάτων.....	39
Συλλογή θρεπτικού μέσου από κύτταρα θηλαστικών και επώαση με streptavidin beads.....	39
Εξισορρόπηση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης (streptavidin beads).....	40
Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών.....	40
Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών.....	42
Δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών (plaque assay).....	43
Τιτλοδότηση μέσω της καταμέτρησης μεμονωμένων κυττάρων που εκφράζουν GFP μετά από μόλυνση με συγκεκριμένες αραιώσεις του	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ	
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ A-IV ΚΑΙ A-II.....	47
Κλωνοποίηση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης A-IV του ανθρώπου.....	47
Έλεγχος της έκφρασης των κατασκευών pcDNA3-apoA-IV και pAd-Track-CMV- apoA-IV.....	48

Κλωνοποίηση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης A-II του ανθρώπου.....	50
Έλεγχος της έκφρασης της κατασκευής pAd-Track-CMV-apoA-II.....	51
Κατασκευή των ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν τις απολιποπρωτεΐνες A-IV και A-II.....	52
ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ A-I.....	55
Δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA3-BIO-C.....	55
Δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA3-BIO-C-apoA-I.....	57
Δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pSecTag-2B-BirA.....	59
Δοκιμασία βιοτινυλίωσης της bio-apoA-I.....	60
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
Δημιουργία ανασυνδυασμένων αδενοϊών για τις apoA-IV και apoA-II με σκοπό την <i>in vivo</i> μελέτη των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών.....	66
Βιοτινυλίωση της εκκρινόμενης apoA-I.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι απολιποπρωτεΐνες είναι δομικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών. Ένα κοινό χαρακτηριστικό της πλεονότητας των απολιποπρωτεϊνών η παρουσία αμφιπαθικών α-ελίκων στη δευτεροταγή δομή τους. Οι αμφιπαθικές αυτές έλικες είναι σημαντικές για την ικανότητα των απολιποπρωτεϊνών να δεσμεύουν λιπίδια. Πέρα όμως από αυτή την ιδιότητα, κάθε απολιποπρωτεΐνη φέρει και κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά ώστε να συμμετέχει ενεργά σε διάφορα βήματα των μονοπατιών σύνθεσης και καταβολισμού λιποπρωτεϊνών.

Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά κάνουν επιτακτική την ανάγκη μελέτης των απολιποπρωτεϊνών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ενώ η απολιποπρωτεΐνη A-I η οποία αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) έχει μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά τη δράση της στο μονοπάτι σχηματισμού της HDL, οι απολιποπρωτεΐνες A-IV και A-II οι οποίες επίσης αποτελούν σε σημαντικό ποσοστό δομικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας. Οι συγκεκριμένες απολιποπρωτεΐνες δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως και η μελέτη της δράσης τους περιορίζεται κυρίως σε *in vitro* προσεγγίσεις μέχρι στιγμής.

Στο πρώτο μέρος, η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είχε ως στόχο τη δημιουργία ανασυνδυασμένων αδενοϊών που θα εκφράζουν τις απολιποπρωτεΐνες A-II και A-IV. Οι συγκεκριμένοι αδενοϊοί στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν για την *in vivo* και *in vitro* μελέτη της δράσης των απολιποπρωτεϊνών αυτών σε πειραματόζωα. Από αυτές τις μελέτες αναμένεται να αποσαφηνιστεί ο τρόπος δράσης των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών *in vivo*.

Στο δεύτερο μέρος, σημαντικός στόχος αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η δημιουργία μιας μορφής της απολιποπρωτεΐνης A-I που να μπορεί να βιοτινυλιωθεί με απώτερο στόχο την ευκολότερη απομόνωση της HDL από το ποντίκι. Καθώς η apoA-I αποτελεί μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη, για την επίτευξη του παραπάνω στόχου καθοριστικής σημασίας ήταν η δημιουργία μιας μορφής της apoA-I που έφερε τον επίτοπο Bio καθώς και μιας εκκρινόμενης μορφής της λιγάσης της βιοτίνης BirA, η οποία έχει την ιδιότητα να βιοτινυλιώνει πρωτεΐνες που φέρουν τον επίτοπο Bio. Η συνέκφραση της εκκρινόμενης BirA και της Bio-apoA-I σε κύτταρα της σειράς HEK 293T οδήγησε τελικά στην βιοτινυλίωση της apoA-I. Μελλοντικά θα κατασκευαστούν αδενοϊοί που θα εκφράζουν την συγκεκριμένη μορφή της apoA-I

που μπορεί να βιοτινυλιωθεί από την BirA και την εκκρινόμενη μορφή της BirA. Η μόλυνση ποντικών με τους συγκεκριμένους αδenoϊούς θα επιτρέψει το σχηματισμό HDL σωματιδίων στο πλάσμα που θα περιέχουν την βιοτινυλιωμένη μορφή της apoA-I.

Η μέθοδος αυτή θα επιτρέψει την ευκολότερη απομόνωση της HDL από το πλάσμα των μολυσμένων ποντικών χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας σφαιρίδια στρεπταβιδίνης-σεφαρόζης τα οποία προσδέουν βιοτίνη με μεγάλη συγγένεια και εξειδίκευση. Ο απώτερος στόχος είναι η μελέτη της δομής και της σύστασης της HDL που σχηματίζεται από μεταλλαγμένες μορφές πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην βιογένεση και τον μεταβολισμό της όπως οι απολιποπρωτεΐνες A-I, A-II A-IV και E, και τα ένζυμα του πλάσματος όπως η LCAT, η CETP και άλλα.

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα της HDL στο πλάσμα αποτελούν έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης. Κατανοώντας τη σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας της HDL μέσω της μελέτης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό της θα κατορθώσουμε να αναπτύξουμε νέες στρατηγικές για τη θεραπεία των δυσλιπιδαιμιών του ανθρώπου που χαρακτηρίζονται από τη μη λειτουργική HDL.

ABSTRACT

The protein components of lipoproteins are apolipoproteins. An important trait of most of the apolipoproteins is the presence of amphipathic α -helices in their secondary structure. The amphipathic α -helices contribute to the lipid-binding properties of the apolipoproteins. In addition to their lipid-binding functions, the apolipoproteins participate to the lipoprotein pathways due to several other characteristics they possess.

In order to investigate the different properties of the apolipoproteins, *in vitro* and *in vivo* studies should be performed. Apolipoprotein A-I is the major protein constituent of high density lipoproteins (HDL) and has been extensively studied *in vitro* and *in vivo* as it plays a crucial role in the HDL biogenesis pathway. ApoA-II and apoA-IV are also important protein constituents of HDL and also participate in the HDL biogenesis pathway. However, the physiological role and the functionality of these two apolipoproteins has not yet been completely understood and more *in vivo* studies should be designed and performed for this purpose.

In the first part of this study, we created two recombinant adenoviruses expressing the apolipoproteins A-II and A-IV respectively. These recombinant adenoviruses are going to be used for studying the properties of apoA-II and apoA-IV both *in vitro* and *in vivo*. We expect that these studies will enlighten us about the functions of these apolipoproteins.

In the second part of this study, we tried to create a form of apoA-I that could be biotinylated. This way HDL particles will be easily isolated from the blood during *in vivo* studies. In order to successfully biotinylate a secreted protein, apoA-I in this case, we created a form of apoA-I fused with the Bio-epitope and a secreted form of the biotin ligase BirA that successfully biotinylates proteins tagged to the Bio-epitope. The cotransfection of the secreted BirA construct along with the bio-apoA-I construct into HEK 293 T cells enabled the biotinylation of the secreted apolipoprotein A-I. In the future, recombinant adenoviruses expressing this particular form of apoA-I and the secreted form of BirA are going to be constructed. We expect that the infection of mice with these adenoviruses will lead to the formation of HDL particles that will contain biotinylated apoA-I.

This way, HDL particles will be easily isolated from the blood plasma of infected mice using high affinity chromatography and more especially Streptavidin-Sepharose beads as these beads bind biotin with very high affinity. This method will contribute to the extensive study of the structure and the composition of HDL particles that are formed when mutated forms of the A-I, A-II, A-IV and E apolipoproteins are involved in the HDL biogenesis pathway.

The results of multiple epidemiological studies show that the low HDL levels in blood plasma are considered as a strong independent risk factor for atherosclerotic vascular disease. The study of different proteins that are involved in the HDL biogenesis pathway will enlighten us about the relationship between the structure and the function of HDL and will hopefully lead us to the development of new strategies concerning the gene therapy of different dyslipidemias.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΟΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ

Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν υδατοδιαλυτά μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων και πρωτεϊνών τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά και την ανακατανομή χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων μέσα στην κυκλοφορία. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος χωρίζονται σε πέντε κύριες κατηγορίες ανάλογα την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και λιπίδια: χυλομικρά, λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL) και λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) (Zannis et al, Loscalzo book, 2004). Οι διαφορές στη σύσταση των λιποπρωτεϊνών σε πρωτεΐνες και λιπίδια τις κάνει να διαφέρουν σε μέγεθος και πυκνότητα. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε λιπίδια είναι ανάλογη με το μέγεθος και αντιστρόφως ανάλογη με την πυκνότητα που χαρακτηρίζει τα σωματίδια των λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος σχηματίζουν είτε δισκοειδή είτε σφαιρικά σωματίδια. Τα δισκοειδή σωματίδια αποτελούνται από πολικά μόρια λιπιδίων (φωσφολιπίδια, χοληστερόλη) και πρωτεϊνών σε μορφή διπλοστιβάδας (bilayer). Τα σφαιρικά σωματίδια διατηρούν ένα υδρόφοβο πυρήνα αποτελούμενο από μη πολικά ουδέτερα λιπαρά (εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια), ο οποίος περιβάλλεται από πολικά μόρια φωσφολιπιδίων, χοληστερόλης και πρωτεϊνών (Zannis et al, Loscalzo book, 2004).

Η σύνθεση και ο καταβολισμός των λιποπρωτεϊνών πραγματοποιούνται μέσα από τρία διαφορετικά μονοπάτια τα οποία όμως αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Πρόκειται για το μονοπάτι των χυλομικρών, το μονοπάτι της LDL/IDL/VLDL και το μονοπάτι της HDL. Η σύνθεση των χυλομικρών ξεκινάει από το έντερο, ενώ η βιογένεση της LDL και της HDL λαμβάνει χώρα στο ήπαρ (Zannis et al, Loscalzo book, 2004).

Οι πρωτεΐνες που αποτελούν συστατικά των λιποπρωτεϊνών ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες. Στον Πίνακα 1 παρατίθενται οι βασικές απολιποπρωτεΐνες, οι λιποπρωτεΐνες που δομούν καθώς και τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 1: Οι απολιποπρωτεΐνες και οι ιδιότητές τους

<i>Όνομα απολιποπρωτεΐνης</i>	<i>Λιποπρωτεΐνη</i>	<i>Ιδιότητες</i>
apoA-I	HDL	Επάγει έξοδο λιπιδίων μέσω του ABCAI, ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT, αλληλεπιδρά με τον SRBI, έχει αθηροπροστατευτική δράση.
apoA-II	HDL	Καταστέλλει τη δράση της ηπατικής λιπάσης, ευνοεί την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης.
apoA-IV	HDL, chylomicrons	Έχει αρκετές ομοιότητες με την apoA-I. Επάγει έξοδο λιπιδίων μέσω του ABCAI, ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT, αλληλεπιδρά με τον SRBI, έχει αθηροπροστατευτική δράση.
apoB	LDL	Αναγνωρίζει τον υποδοχέα LDLr, επάγει το σχηματισμό VLDL.
apoC-I	VLDL, HDL	Ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT.
apoC-II	VLDL, HDL	Ενεργοποιεί το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση.
apoC-III	VLDL, HDL	Παρεμποδίζει τον καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών.
apoC-IV	VLDL	Συνεισφέρει στη διατήρηση της ομοιόστασης των τριγλυκεριδίων του πλάσματος.
apoA-V	VLDL, HDL	Συνεισφέρει στη διατήρηση της ομοιόστασης των τριγλυκεριδίων του πλάσματος.
apoE	VLDL, HDL	Αναγνωρίζει τον υποδοχέα LDLr.

(Zannis et al, Loscalzo book, 2004)

ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΗΣ HDL

Η βιογένεση της HDL πραγματοποιείται μέσω ενός ιδιαίτερα πολύπλοκου μονοπατιού το οποίο αναφέρεται και ως μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Οι βασικές απολιποπρωτεΐνες που δομούν την HDL είναι η apoA-I σε μεγαλύτερο ποσοστό από τις υπόλοιπες, η apoA-II, και σε μικρότερα ποσοστά συναντάμε τις apoCs, apoE και apoA-IV (Zannis et al, Loscalzo book, 2004).

Στα πρώτα στάδια του μονοπατιού, η απολιποπρωτεΐνη A-I εκκρίνεται σε ελεύθερη λιπιδίων μορφή από το ήπαρ και αλληλεπιδρά με τον διαμεμβρανικό μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των μακροφάγων κυττάρων (Langmann et al, 1999). Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης επάγεται έξοδος χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από τα μακροφάγα και η apoA-I αρχίζει να λιπιδιώνεται (Zannis et al, 2001). Μέσω ενδιάμεσων βημάτων τα οποία δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί πλήρως η apoA-I αποκτά περισσότερα λιπίδια και σχηματίζει δισκοειδή σωματίδια HDL. Στη συνέχεια με τη δράση του ενζύμου LCAT (lecithin:cholesterol acyl transferase), το οποίο είναι υπεύθυνο για την εστεροποίηση της χοληστερόλης, τα δισκοειδή σωματίδια μετατρέπονται σε ώριμα σφαιρικά σωματίδια HDL (Soutar et al, 1975). Τα HDL σωματίδια στη συνέχεια έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς ABCG1 και ABCG4 οι οποίοι προάγουν την έξοδο χοληστερόλης από τα μακροφάγα προς HDL σωματίδια συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ομοιόστασης των λιπιδίων στον οργανισμό (Wang et al, 2004). Τόσο τα δισκοειδή όσο και τα σφαιρικά σωματίδια HDL αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα SR-BI (scavenger receptor – class B type I) που εκφράζεται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και σε αδένες όπου διεξάγεται η σύνθεση στεροειδών ορμονών (Acton et al, 1996). Από εκεί, η χοληστερόλη μπορεί είτε να μπει στο μονοπάτι σύνθεσης των χολικών οξέων, είτε να μετάσχει στη σύνθεση στεροειδών ορμονών, είτε να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών. Τα επόμενα βήματα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL περιλαμβάνουν την μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL σε VLDL και LDL, την υδρόλυση τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων της HDL από τα ένζυμα λιποπρωτεϊνική λιπάση και ηπατική λιπάση και την μεταφορά φωσφολιπιδίων από τις VLDL και LDL στην HDL μέσω της δράσης του ενζύμου μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP) (Zannis et al, Loscalzo book, 2004).

Η HDL βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος σε διάφορες μορφές με βάση την περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Ωστόσο τα HDL σωματίδια διαφέρουν και ως προς την πρωτεϊνική τους σύσταση η οποία όπως θα δούμε και παρακάτω επηρεάζει σημαντικά την αθηροπροστατευτική δράση της HDL (Schultz et al, 1993; Cohen et al, 1997).

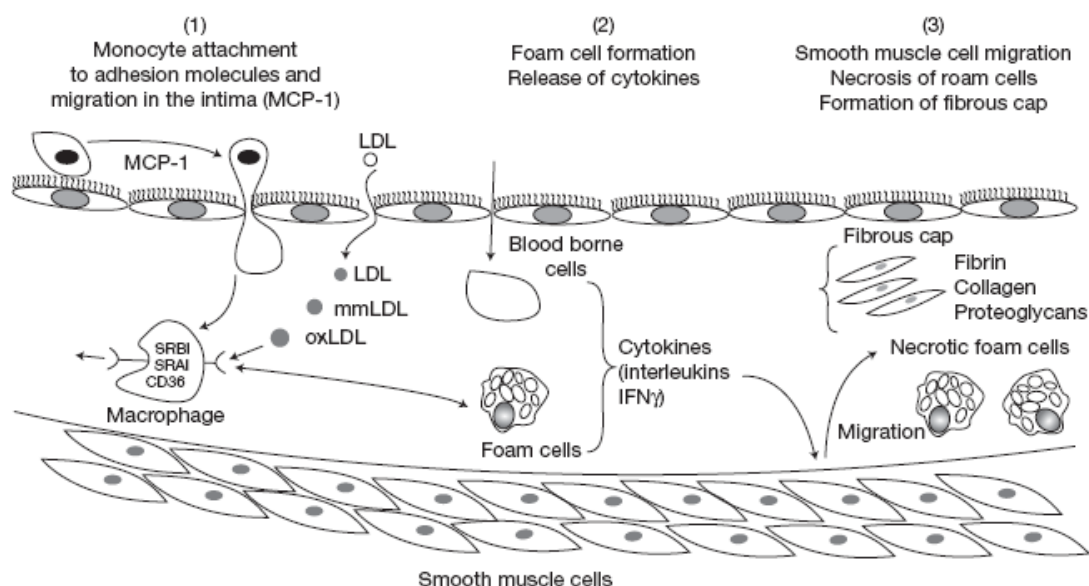
Η ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ HDL ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Τα επίπεδα συγκέντρωσης HDL (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας) στο πλάσμα του αίματος είναι άμεσα συχρητισμένα με την προστασία του οργανισμού από την εμφάνιση αθηρωμάτωσης. Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών χαρακτηρίζεται αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης HDL στον άνθρωπο αλλά και στα ποντίκια.

Χαρακτηριστικά της αθηρωμάτωσης

Η αθηρωμάτωση αποτελεί μία εκφυλιστική νόσο των αρτηριακών τοιχωμάτων, η οποία χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών στα τοιχώματα των μεγάλων και μεσαίων αρτηριών. Τα πρώτα στάδια που μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών (Εικ.1) περιλαμβάνουν την στρατολόγηση και μετανάστευση μονοκυττάρων στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο των αγγείων (subendothelial space) όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η μετανάστευση των μονοκυττάρων αλλά και αρκετών λείων μυϊκών κυττάρων επάγεται από τη δράση χυμοτακτικών παραγόντων όπως η πρωτεΐνη MCP-1 (monocyte chemotactic protein - 1) αλλά και από την ύπαρξη οξειδωμένης LDL. Στη συνέχεια τα μακροφάγα κύτταρα μέσω της δράσης συγκεκριμένων υποδοχέων τους (scavenger receptors) προσλαμβάνουν χοληστερόλη και φωσφολιπίδια κυρίως από την οξειδωμένη LDL. Η χοληστερόλη που προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα αποθηκεύεται με τη μορφή εστέρων χοληστερόλης σε σταγονίδια λιπιδίων (lipid droplets). Σε πιο προχωρημένα στάδια, η συσσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα και στα λεία μυϊκά κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει οδηγεί στο σχηματισμό των λεγόμενων αφρωδών κυττάρων (foam cells) τα οποία αποτελούν το βασικό χαρακτηριστικό των αθηρωματικών

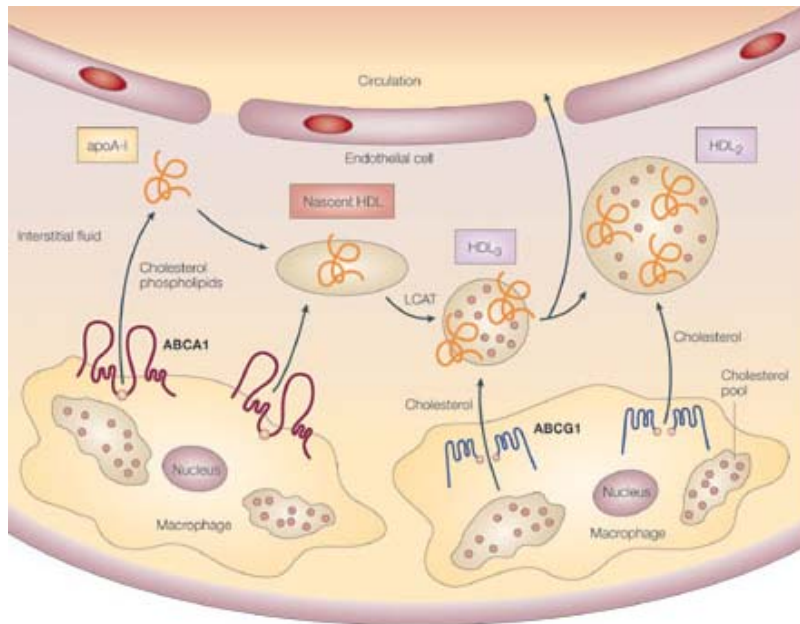
πλακών (Spady et al, 1999). Η συνεχής συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης οδηγεί τελικά στη νέκρωση των αφρώδων κυττάρων τα οποία εναποτίθενται στα τοιχώματα των αγγείων σχηματίζοντας συνεχώς αναπτυσσόμενες αθηρωματικές πλάκες (Zannis et al, Loscalzo book, 2004; Li and Glass, 2002). Η θραύση των αθηρωματικών πλακών οδηγεί τελικά στο σχηματισμό θρόμβων και την απόφραξη των αγγείων.



Εικ.1: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας των γεγονότων που τελικά οδηγεί στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών στα αρτηριακά τοιχώματα (Zannis et al, Loscalzo book, 2004).

Το μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης

Η HDL δρα προστατευτικά συμμετέχοντας στο μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (Εικ.2) το οποίο όπως έχουμε ήδη αναφέρει περιλαμβάνει την έξοδο περίσσειας κυτταρικής χοληστερόλης από τα μακροφάγα της περιφέρειας προς τις απολιποπρωτεΐνες A-I και A-IV και τα νεο-σχηματισμένα HDL σωματίδια, και τη μεταφορά της στο ήπαρ όπου είτε θα μπει στο μονοπάτι των χολικών οξέων είτε θα χρησιμοποιηθεί ως δομικό συστατικό βιολογικών μεμβρανών αλλά και σε αδένες για να μετάσχει στο σχηματισμό στεροειδών ορμονών. Η μη εύρυθμη λειτουργία του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης οδηγεί στη συσσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα και την μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα, με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών (Spady et al, 1999).



Εικ.2: Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από περιφερικά μακροφάγα κύτταρα στην ελεύθερη λιπιδίων apoA-I και σχηματισμός HDL σωματιδίων (*Linsell-Nitschke and Tall, 2005*).

Η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση της HDL

Επιπλέον, η HDL μπορεί να καθυστερήσει την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών μέσα από την αντι-οξειδωτική και αντι-φλεγμονώδη δράση της (Hessler et al, 1979). Η οξειδωμένη LDL είναι κυτταροτοξική και παίζει σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια σχηματισμού αθηρωματικών πλακών καθώς μπορεί να επάγει χυμοτακτικά τα μονοκύτταρα προσελκύνοντάς τα στο αρτηριακό τοίχωμα. Στη συνέχεια δεσμεύεται σε υποδοχείς (scavenger receptors) των μακροφάγων έχοντας σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στα κύτταρα αυτά και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Τα ένζυμα παραοξονάση και PAF-AH (platelet activating factor acetyl hydrolase) συνεισφέρουν στην αντι-οξειδωτική δράση της HDL, καθώς εμποδίζουν την οξείδωση φωσφολιπιδίων της LDL (Navab et al, 2001). Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο παραοξονάση αποτελεί μία Ca-εξαρτώμενη εστεράση που βρίσκεται δεσμευμένη στην επιφάνεια των HDL σωματιδίων και έχει την ιδιότητα να υδρολύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Ferretti et al, 2005). Με αυτόν τον τρόπο η HDL εμποδίζει την οξείδωση της LDL η οποία μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών.

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι απολιποπρωτεΐνες αποτελούν δομικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών. Ένα κοινό χαρακτηριστικό μιας ομάδας απολιποπρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις apoA-I, apoA-II, apoA-IV και apoE είναι η παρουσία αμφιπαθικών α-ελίκων στη δευτεροταγή δομή τους. Οι δομές αυτές είναι σημαντικές για τη λειτουργικότητα των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών και σχετίζονται με την ικανότητα δέσμευσης λιπιδίων (Segrest et al, 1992). Όμως πέρα από την ικανότητα δέσμευσης λιπιδίων οι απολιποπρωτεΐνες έχουν και άλλες ιδιότητες κάποιες από τις οποίες περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-IV

Το γονίδιο της apoA-IV

Το γονίδιο της apoA-IV έχει μέγεθος 2594 ζεύγη βάσεων (base pairs) και αποτελείται από 3 εξόνια και 2 ιντρόνια. Χαρτογράφηση του γονιδίου της apoA-IV έδειξε ότι εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 του ανθρώπου, στο ίδιο σύμπλεγμα με τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών apoA-I και apoCIII (Karathanasis, 1985).

Η απολιποπρωτεΐνη A-IV

Η κωδική αλληλουχία (CDS) της apoA-IV αποτελείται από 1190 νουκλεοτίδια τα οποία κωδικοποιούν για μία πρόδρομη μορφή της ώριμης apoA-IV (pre-protein), αποτελούμενη από 396 αμινοξέα. Η pre-apoA-IV φέρει στο αμινοτελικό της άκρο ένα pre-πεπτίδιο 20 αμινοξέων το οποίο αποκόπτεται κατά τη μετακίνηση της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Έτσι προκύπτει η ώριμη μορφή της apoA-IV, η οποία στον άνθρωπο αποτελείται από 376 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 46 kDa (Swaney et al, 1974; Elshourbagy et al, 1987).

Η δευτεροταγής δομή της apoA-IV έχει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με τη δομή άλλων απολιποπρωτεϊνών όπως η apoA-I και η apoE. Αποτελείται από επαναλήψεις 22- και 11- αμινοξέων που οργανώνονται σε αμφιπαθικές α-έλικες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ικανότητα των απολιποπρωτεϊνών να δεσμεύουν λιπίδια (Segrest et

al, 1992). Το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της apoA-IV προβλέπει την ύπαρξη 13 τέτοιων αμφιπαθικών α-ελίκων οι οποίες σχηματίζουν μία ιδιαίτερα κλειστή δομή στο χώρο (Tubb et al, 2008). Σε σχέση με τις υπόλοιπες απολιποπρωτεΐνες η apoA-IV καταβολίζεται γρηγορότερα καθώς ο χρόνος ημιζωής της υπολογίζεται στις 6 με 18 ώρες.

Η απολιποπρωτεΐνη A-IV ανακαλύφθηκε το 1974 ως δομικό συστατικό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) στον αρουραίο (Swaney et al, 1974), ενώ στον άνθρωπο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1979 ως συστατικό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (χυλομικρά και VLDL) (Beisiegel et al, 1979; Green et al 1979). Συντίθεται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και στη συνέχεια εκκρίνεται στη λέμφο ως βασικό συστατικό των χυλομικρών (Green et al, 1980). Μετά την υδρόλυση των χυλομικρών μέσω της δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, ένα σημαντικό ποσοστό της apoA-IV συμμετέχει στο σχηματισμό σωματιδίων HDL ενώ ένα άλλο σημαντικό ποσοστό της εντοπίζεται στο πλάσμα του αίματος σε ελεύθερη λιπιδίων μορφή. Η ύπαρξη σημαντικού ποσοστού της apoA-IV στην ελεύθερη λιπιδίων μορφή της στο πλάσμα του αίματος τόσο στον άνθρωπο και τον ποντικό όσο και σε άλλα είδη είναι χαρακτηριστική και οφείλεται στη μειωμένη συγγένεια με την οποία η apoA-IV λόγω του πιο υδρόφιλου χαρακτήρα της δεσμεύει λιπίδια σε σχέση με την apoA-I (Pearson et al, 2004).

Η δράση της απολιποπρωτεΐνης A-IV

Ο φυσιολογικός ρόλος της apoA-IV δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και υπάρχουν ενδείξεις ότι η συγκεκριμένη απολιποπρωτεΐνη εμπλέκεται ποικιλοτρόπως στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απορρόφησης των λιπιδίων από τον οργανισμό καθώς τα επίπεδα έκφρασής της αυξάνονται μετά την κατανάλωση γεύματος πλούσιου σε λιπαρά (Green et al, 1979) ενώ όπως θα δούμε παρακάτω εμπλέκεται και στο μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης και στην προστασία των λιπιδίων από την οξείδωση (Ostos et al, 2001).

Η ελεύθερη λιπιδίων μορφή της apoA-IV παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης και κατ' επέκταση στην προστασία του οργανισμού ενάντια στην αθηρωμάτωση. Έχει την ικανότητα να δένεται στα περιφερικά μακροφάγα, να επάγει έξοδο χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από αυτά

μέσω του διαμεμβρανικού μεταφορέα ABCA1 και να σχηματίζει σωματίδια HDL (Oram et al, 1996; Fournier et al, 2000; Remaley et al, 2001). Έχει επίσης, όπως και η απολιποπρωτεΐνη A-I, την ικανότητα να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT το οποίο όπως έχουμε ήδη αναφέρει είναι υπεύθυνο για την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης στα HDL σωματίδια (Steinmetz et al, 1985).

In vitro μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι σωματίδια HDL απομονωμένα από διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν apoA-IV μπορούν να επάγουν την έξοδο χοληστερόλης από καλλιέργειες μακροφάγων κυττάρων πολύ πιο αποτελεσματικά σε σχέση με σωματίδια HDL απομονωμένα από αγρίου τύπου ποντίκια (Cohen et al, 1997).

In vivo μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την απολιποπρωτεΐνη apoA-IV είτε του ποντικού είτε του ανθρώπου, εμφανίζουν σημαντική μείωση ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών σε σύγκριση με ποντίκια αγρίου τύπου μετά από χορήγηση διαίτας δυτικού τύπου (Cohen et al, 1997; Duverger et al, 1996). Η ανάλυση του λιποπρωτεϊνικού προφίλ έδειξε ότι τα μειωμένα επίπεδα αθηρωματικών πλακών στα ζώα αυτά σχετίζονται όχι μόνο με τα αυξημένα επίπεδα HDL αλλά και τη διαφορετική σύσταση των HDL σωματιδίων (αυξημένη περιεκτικότητα σε apoA-IV) σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια.

Η απουσία της apoA-IV στα ποντίκια δεν φαίνεται να επιδρά σημαντικά στην απορρόφηση λιπιδίων, ωστόσο τα ποντίκια αυτά έχουν χαμηλά επίπεδα HDL και HDL-χοληστερόλης σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια (Weinstock et al, 1997).

Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η apoA-IV παίζει σημαντικό ρόλο και στην αντιοξειδωτική δράση της HDL. Η υπερέκφραση της apoA-IV οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών σε ποντίκια apoE^{-/-} τα οποία εμφανίζουν σοβαρής μορφής αθηρωμάτωση από πολύ νεαρή ηλικία χωρίς όμως να αυξηθούν τα επίπεδα της HDL γεγονός που δείχνει ότι ο προστατευτικός ρόλος της apoA-IV ενάντια στην αθηρωμάτωση δεν σχετίζεται μόνο με τη δράση της μέσω του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (Duverger et al, 1996; Ostos et al, 2001). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι σωματίδια HDL απομονωμένα από διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την apoA-IV εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας την LDL από την οξείδωση, ενώ στα συγκεκριμένα HDL σωματίδια φαίνεται αυξημένη και η δραστηριότητα του ενζύμου παραοξονάση (Cohen et al. 1997).

Φαίνεται λοιπόν ότι η apoA-IV δρα προστατευτικά ενάντια στην αθηρωμάτωση τόσο μέσω του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης όσο και μέσω της αντι-οξειδωτικής της δράσης.

Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-II

Το γονίδιο της apoA-II

Το γονίδιο για την ανθρώπινη apoA-II έχει μέγεθος 1540 ζεύγη βάσεων (base pairs) και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (Brewer et al, 1986). Χαρτογράφηση του γονιδίου της apoA-II έδειξε ότι εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 του ανθρώπου (Lackner et al, 1984).

Η απολιποπρωτεΐνη A-II

Η apoA-II συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ.

Η κωδική αλληλουχία της apoA-II αποτελείται από 302 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν για μια πρόδρομη μορφή της apoA-II (pre-pro-apoA-II) αποτελούμενη από 100 αμινοξέα. Ένα pre-πεπτίδιο 18 αμινοξέων και ένα pro-πεπτίδιο 5 αμινοξέων αποκόπτονται μετα-μεταφραστικά ώστε να σχηματιστεί τελικά η ώριμη apoA-II. Στον άνθρωπο, η ώριμη apoA-II βρίσκεται στο πλάσμα ως ένα διμερές το οποίο αποτελείται από δύο όμοιες πολυπετιδικές αλυσίδες των 77 αμινοξέων ενωμένες μέσω μιας δισουλφιδικής γέφυρας (Brewer et al, 1986).

Η δράση της απολιποπρωτεΐνης A-II

Το μεγαλύτερο ποσοστό της apoA-II στον ανθρώπινο οργανισμό εντοπίζεται ως συστατικό των HDL σωματιδίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απολιποπρωτεΐνη apoA-II είναι η δεύτερη σε αφθονία απολιποπρωτεΐνη στα σωματίδια HDL μετά την apoA-I. (Warden et al, 1993).

Σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, τα αυξημένα επίπεδα της apoA-II φαίνεται να παρεμποδίζουν την ομαλή λειτουργία του

μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης αλλά και την αντιοξειδωτική δράση της HDL με αποτέλεσμα την εμφάνιση αθηρωμάτωσης.

Πιο συγκεκριμένα, ενώ τα HDL σωματίδια που δεν περιέχουν apoA-II παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από την αθηρωμάτωση μέσω του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης αλλά και μέσω της αντιοξειδωτικής και αντι-φλεγμονώδους δράσης τους, τα HDL σωματίδια που περιέχουν και apoA-II φαίνεται από *in vivo* μελέτες να έχουν μειωμένη αθηροπροστατευτική δράση (Schultz et al, 1993). Συγκεκριμένα, διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν apoA-II εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα HDL στο πλάσμα του αίματος, ωστόσο αντίθετα από τα ποντίκια που υπερεκφράζουν apoA-I, εμφανίζουν και αυξημένα επίπεδα ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών ακόμα και στην περίπτωση που δεν τους χορηγείται δίαιτα δυτικού τύπου (πλούσια σε λιπαρά και χοληστερόλη) (Warden et al, 1993). *In vitro* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι σωματίδια HDL που περιέχουν και apoA-II εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα επαγωγής εξόδου χοληστερόλης από συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (Lagrost et al, 1995; Stein et al, 1995) ενώ σε άλλες κυτταρικές σειρές η παρουσία ή μη της apoA-II σε HDL σωματίδια δεν επηρεάζει το ρυθμό εξόδου χοληστερόλης. Επιπλέον, τα σωματίδια HDL που δεν περιέχουν apoA-II αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερη συγγένεια με τον υποδοχέα SR-BI στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων σε σχέση με τα σωματίδια HDL που δομούνται και από την apoA-I και από την apoA-II (De Beer et al, 2001). Φαίνεται από τα παραπάνω, ότι παρόλο που τα υψηλά επίπεδα HDL είναι άμεσα συνδεδεμένα με την προστασία του οργανισμού ενάντια στην αθηρωμάτωση, η πρωτεϊνική σύσταση των HDL σωματιδίων επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες και τον τρόπο δράσης τους .

Η υπερέκφραση της apoA-II σε ποντίκια φαίνεται να σχετίζεται και με την εμφάνιση υπερτριγλυκεριδαϊμίας. *In vivo* μελέτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα apoA-II μετατρέπουν τις λιποπρωτεΐνες σε πιο «φτωχά» υποστρώματα για τη δράση ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την υδρόλυση τριγλυκεριδίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση υψηλών επιπέδων τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος (Castellani et al, 2008).

Αντίθετα, ποντίκια που δεν εκφράζουν apoA-II (apoA-II^{-/-}) δεν εμφανίζουν κάποια ιδιαιτερότητα όσον αφορά το λιποπρωτεϊνικό προφίλ τους αλλά ούτε και αυξημένα επίπεδα αθηρωματικών πλακών.

Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Α-I

Το γονίδιο της apoA-I

Το γονίδιο της apoA-I έχει μέγεθος 1863 ζεύγη βάσεων (base pairs) και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια. Χαρτογράφηση του γονιδίου της apoA-I έδειξε ότι εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 του ανθρώπου, στο ίδιο σύμπλεγμα με τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών apoA-IV και apoCIII (Karathanasis et al, 1983).

Η απολιποπρωτεΐνη Α-I

Η ανθρώπινη apoA-I συντίθεται κυρίως στο ήπαρ αλλά και στο λεπτό έντερο. Η αλληλουχία του cDNA της apoA-I αποτελείται από 878 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν για μία πρόδρομη μορφή της apoA-I (pre-pro-apoA-I) αποτελούμενη από 267 αμινοξέα. Ένα pre-πεπτίδιο 18 αμινοξέων και ένα pro-πεπτίδιο 6 αμινοξέων αποκόπτονται μετα-μεταφραστικά ώστε να σχηματιστεί τελικά η ώριμη apoA-I η οποία αποτελείται από 243 αμινοξέα.

Η ώριμη apoA-I αποτελείται από επαναλήψεις 22 και 11 αμινοξέων οι οποίες με βάση κρυσταλλογραφικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί, οργανώνονται σε αμφιπαθικές α-έλικες (Bohiani et al, 1997). Σύμφωνα με την πρόσφατα δημοσιευμένη κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης, η apoA-I στην ελεύθερη λιπιδίων μορφή της αποτελείται από ένα δεμάτι τεσσάρων ελίκων στο αμινοτελικό της άκρο και δύο επιπλέον έλικες στο καρβοξυτελικό της άκρο (Ajees et al, 2006).

Ποντίκια που δεν εκφράζουν apoA-I εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα HDL στο αίμα (Williamson et al, 1992).

Η δράση της απολιποπρωτεΐνης Α-I

Η apoA-I στον άνθρωπο εκκρίνεται από το ήπαρ σε ελεύθερη λιπιδίων μορφή και αποτελεί τη σημαντικότερη απολιποπρωτεΐνη που δομεί την HDL. Παίζει πρωταρχικό ρόλο στο μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης και το σχηματισμό σωματιδίων HDL συμβάλλοντας ουσιαστικά στην προστασία του οργανισμού από την εμφάνιση αθηρωμάτωσης.

Η apoA-I αλληλεπιδρά με τον διαμεμβρανικό μεταφορέα ABCA1 που εκφράζεται στα μακροφάγα κύτταρα και επάγει μέσω αυτού έξοδο χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από αυτά (Chroni et al, 2003). Η apoA-I λιπιδιώνεται σταδιακά και σχηματίζει τα δισκοειδή HDL σωματίδια. Στη συνέχεια η apoA-I δρα ως ο κύριος φυσιολογικός ενεργοποιητής του ενζύμου LCAT (Lecithin:Cholesterol Acyltransferase) το οποίο αλληλεπιδρά με τη μη εστεροποιημένη χοληστερόλη των HDL σωματιδίων και οδηγεί στο σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης που μεταφέρονται και συγκρατούνται στον πυρήνα της HDL μετατρέποντας τα δισκοειδή σωματίδια σε σφαιρικά (Soutar et al, 1975). Στη συνέχεια, η apoA-I ως συστατικό της HDL, αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα SR-BI που εκφράζεται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη χοληστερόλης από την HDL (Shangzhe et al, 1997).

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση της HDL, η apoA-I παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων που συναντάμε στην HDL όπως η παραοξονάση (Sorenson et al, 1999).

Η απουσία της apoA-I στον άνθρωπο είναι σπάνια και συνήθως συνοδεύεται από εμφάνιση πρώιμης αθηρωμάτωσης, εμφάνιση ξανθωμάτωσης και βλάβες στον κερατοειδή χιτώνα. Οι φυσικές μεταλλάξεις της apoA-I που έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο σχετίζονται κατά κανόνα με αντικαταστάσεις αμινοξέων και χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα επίπεδα HDL στους φορείς τους, μεταλλάξεις που προκαλούν αμυλοείδωση (αυτοσωμική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από εξωκυττάρια συσσώρευση αδιάλυτων ινιδίων αμυλοειδούς που οφείλεται σε απόθεση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ή τμημάτων πρωτεϊνών που προέρχονται από πρωτεόλυση και προκαλούν νευροπάθεια, νεφροπάθεια και καρδιομυοπάθεια) και μεταλλάξεις που δεν προκαλούν μεταβολές στην HDL.

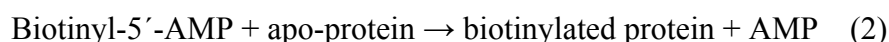
BIOTINYΛΙΩΣΗ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Χαρακτηριστικά της βιοτίνης

Η βιοτίνη (βιταμίνη Η) αποτελεί ένα συνένζυμο απαραίτητο για κάθε μορφή ζωής, το οποίο συντίθεται από τα ανώτερα φυτά, τα βακτήρια και κάποια είδη μυκήτων (Polyak and Chapman-Smith, 2004). Θηλαστικά αλλά και άλλα ανώτερα ζώα δεν έχουν την ικανότητα να την συνθέσουν *de novo* κάνοντας έτσι απαραίτητη την πρόσληψή της μέσω της διατροφής. Η βιοτίνη δρα σαν συνένζυμο για μία συγκεκριμένη κατηγορία ενζύμων που παίζουν ρόλο στην κατάλυση μιας σειράς αντιδράσεων του μεταβολισμού που έχουν να κάνουν με τη μεταφορά καρβοξυλομάδων (π.χ. σύνθεση λιπαρών οξέων) (Cronan, 1990) .

Η βιοτινυλίωση αποτελεί ένα είδος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης στην οποία υπόκεινται μόνο κάποια συγκεκριμένα ένζυμα του μεταβολισμού και πραγματοποιείται μέσω της δράσης του ενζύμου λιγάση της βιοτίνης (biotin protein ligase) το οποίο αναγνωρίζει συγκεκριμένες συντηρημένες αλληλουχίες στα ένζυμα αυτά (Cronan, 1990). Η λιγάση της βιοτίνης καταλύει το σχηματισμό ενός αμιδικού δεσμού ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα της βιοτίνης και την ε-αμινομάδα συγκεκριμένου αμινοξικού καταλοίπου λυσίνης της πρωτεΐνης-υπόστρωμα μέσω μίας αντίδρασης δύο σταδίων (Cronan, 1990; Wood and Barden, 1997). Οι αμινοξικές αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν του συγκεκριμένου καταλοίπου λυσίνης παρουσιάζουν αυξημένη ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων διαφόρων ειδών. Τα συντηρημένα αυτά αμινοξέα που περιβάλλουν τη λυσίνη είναι απαραίτητα για την βιοτινυλίωση του συγκεκριμένου αμινοξέος καθώς η απαλοιφή των αμινοξικών αυτών αλληλουχιών έχει σαν αποτέλεσμα η πρωτεΐνη υπόστρωμα να μην μπορεί να βιοτινυλωθεί (Polyak and Chapman-Smith, 2004).

Όλες οι λιγάσες της βιοτίνης καταλύουν την αντίδραση της βιοτινυλίωσης μέσω του ίδιου μηχανισμού αντίδρασης, αποτελούμενου από δύο διακριτά στάδια:



Η λιγάση της βιοτίνης BirA

Η πρωτεΐνη BirA του βακτηρίου *E.coli* αποτελεί την καλύτερα χαρακτηρισμένη λιγάση βιοτίνης. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκτός από τη δράση της ως λιγάση της βιοτίνης, λειτουργεί και ως μεταγραφικός καταστολέας του βιοσυνθετικού οπερονίου της βιοτίνης αποτελώντας έτσι έναν εξαιρετικό μηχανισμό για διατήρηση της ομοιόστασης της βιοτίνης στο συγκεκριμένο οργανισμό (Polyak and Chapman-Smith, 2004). Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της BirA έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από τρεις διακριτές χαρακτηριστικές περιοχές (domains):

- i) το αμινοτελικό άκρο που έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο DNA
- ii) ένα central catalytic domain που έχει την ικανότητα να δεσμεύει βιοτίνη
- iii) και το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης.

In vivo η BirA βιοτινυλιώνει μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη, την ακετυλ-CoA-καρβοξυλάση. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη απαντά σε όλους τους οργανισμούς και αποτελεί ένα ένζυμο απαραίτητο για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Polyak and Chapman-Smith, 2004).

In vitro βιοτινυλίωση πρωτεϊνών

Η αλληλεπίδραση μεταξύ αβιδίνης ή στρεπταβιδίνης και βιοτίνης αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις (ισχυρότερη ακόμα και από την αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος) που βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς της μοριακής βιολογίας (ανίχνευση, ακινητοποίηση και καθαρισμός πρωτεϊνών, γονιδιακή θεραπεία μέσω της χρήσης αδενοϊών, drug targeting). Ένα πεπτίδιο που μπορεί να βιοτινυλιωθεί (biotin acceptor domain) μπαίνει σε σύντηξη με το αμινοτελικό ή το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να βιοτινυλώσουμε και στη συνέχεια με την συν-έκφραση της λιγάσης της βιοτίνης BirA η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει βιοτινυλιώνεται (Cronan, 1990).

Ωστόσο, η τεχνολογία της βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών μπορούσε να εφαρμοστεί αρχικά μόνο σε περιπτώσεις κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, δηλαδή πρωτεϊνών που κατά την σύνθεση και την ωρίμανση τους δεν περνούν μέσα από το εκκριτικό μονοπάτι. Όσον αφορά τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων, η έκφραση μιας εκκρινόμενης μορφής του ενζύμου της λιγάσης της

βιοτίνης θεωρηθήκε ότι θα μπορούσε να οδηγήσει στη βιοτινυλίωση αυτών των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα *in vitro* πειραμάτων έδειχναν ότι εκκρινόμενες πρωτεΐνες που βρίσκονταν σε σύντηξη με ένα biotin acceptor domain εκφράζονταν μεν φυσιολογικά αλλά ωστόσο δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση βιοτινυλίωσης. Το γονίδιο της BirA κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης σχεδιασμένο να φέρει οδηγό-πεπτίδιο που θα οδηγήσει την πρωτεΐνη μέσα από το εκκριτικό μονοπάτι και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών οι οποίες είχαν συνεπιμολυνθεί με εκκρινόμενες πρωτεΐνες που βρίσκονταν σε σύντηξη με ένα biotin acceptor domain. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων έδειξαν ότι η συν-έκφραση μίας εκκρινόμενης μορφής του ενζύμου BirA είχε σαν αποτέλεσμα τελικά την βιοτινυλίωση εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Parrott et al, 2001).

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι απολιποπρωτεΐνες A-IV, A-II και A-I αποτελούν τις βασικές απολιποπρωτεΐνες που δομούν την HDL με τις apoA-I και apoA-II να συναντώνται σε μεγαλύτερη αφθονία σε σχέση με την apoA-IV. Μέχρι στιγμής η apoA-I έχει μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά τη δομή και τα χαρακτηριστικά της αλλά και τη δράση της στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL. Αντίθετα, οι απολιποπρωτεΐνες A-II και A-IV δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως και κάποιες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στηρίζονται σε *in vitro* προσεγγίσεις.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έχει ως πρωταρχικό στόχο τη δημιουργία ανασυνδυασμένων αδενοϊών που θα εκφράζουν τις απολιποπρωτεΐνες A-II και A-IV του ανθρώπου. Οι συγκεκριμένοι αδενοϊοί μπορούν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν για την *in vitro* και *in vivo* μελέτη της δράσης των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών σε πειραματόζωα ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL.

Ένας δεύτερος σημαντικός στόχος της διατριβής είναι η δημιουργία μιας μορφής της apoA-I που να μπορεί να βιοτινυλιωθεί από τη λιγάση της βιοτίνης BirA και η δημιουργία μιας εκκρινόμενης μορφής της BirA η οποία θα μπορεί να βιοτινυλώσει την εκκρινόμενη apoA-I. Μελλοντικά θα κατασκευαστούν αδενοϊοί που θα εκφράζουν την μορφή της apoA-I που μπορεί να βιοτινυλιωθεί και την εκκρινόμενη μορφή της BirA. Η μόλυνση ποντικών με τους παραπάνω αδενοϊούς θα οδηγήσει στο σχηματισμό HDL σωματιδίων στο πλάσμα των ζώων που θα περιέχουν την βιοτινυλιωμένη μορφή της apoA-I.

Η παραπάνω μέθοδος θα επιτρέψει την ευκολότερη απομόνωση της HDL από το πλάσμα με απώτερο στόχο την μελέτη της δομής και της σύστασης της HDL που σχηματίζεται από μεταλλαγμένες μορφές πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην βιογένεση και τον μεταβολισμό της όπως οι απολιποπρωτεΐνες A-I, A-II, A-IV και E, αλλά και ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι όπως η LCAT.

Η κατανόηση της σχέσης μεταξύ δομής και λειτουργίας της HDL μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών για τη θεραπεία των δυσλιπιδαιμιών του ανθρώπου που χαρακτηρίζονται από τη μη-λειτουργική HDL.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών

Τα ένζυμα περιορισμού και τα ρυθμιστικά τους διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών, αγοράστηκαν από τις εταιρείες New England Biolabs και Minotech. Οι DNA πολυμεράσες και τα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Promega. Το ένζυμο T4 ligase που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις σύνδεσης καθώς και το ρυθμιστικό του διάλυμα αγοράστηκαν από την εταιρεία New England Biolabs. Οι εκκινητές για τις αντιδράσεις PCR και τα ολιγονουκλεοτίδια για την πλασμιδιακή κατασκευή pcDNA3-BioC αγοράστηκαν από το εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB). Για τη δημιουργία των πλασμιδιακών κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pcDNA3 της Invitrogen και pAd-Track-CMV. Ο πλασμιδιακός φορέας pSec-Tag-2B που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pSec-Tag-2B-BirA ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του κ. Λούη. Το ένζυμο RNase A αγοράστηκε από την Sigma. Ο δείκτης μοριακού βάρους λ BstEII κατασκευάστηκε με πέψη του DNA του βακτηριοφάγου λ που αγοράστηκε από την εταιρεία New England Biolabs με το περιοριστικό ένζυμο BstEII.

Το θρεπτικό υλικό κατά **Luria Bertani (LB)** με ή χωρίς άγαρ που χρησιμοποιήθηκε για τις υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων περιέχει bacto-agar, bacto-tryptone και yeast extract της εταιρείας Difco. Η αγαρόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS ενώ χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαφόρων διαλυμάτων, χημικά των εταιρειών Merck και Sigma καθώς και άλλων εμπορικών πηγών. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το Plasmid kit της εταιρείας Qiagen ενώ για την απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System της εταιρείας Promega.

Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Το θρεπτικό υλικό **Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)**, ο ορός **Fetal Bovine Serum (FBS)**, ο ορός **Heat Inactivated Horse Serum (HIHS)**, το ένζυμο **Trypsin-EDTA** καθώς και τα αντιβιοτικά **Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη** αγοράστηκαν από την **Gibco-BRL**.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Το πολυκλωνικό αντίσωμα **goat anti-human apolipoprotein AI** αγοράστηκε από την εταιρεία **Millipore**. Το δευτερεύον αντίσωμα **anti-goat HRP-conjugated** αγοράστηκε από την **Sigma**. Το αντίσωμα **Streptavidin-HRP conjugated** για την ανίχνευση των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών αγοράστηκε από την **Sigma**. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης **Protran** αγοράστηκαν από την εταιρεία **Schleicher & Schuell**.

RNA extraction & RT-PCR

Το αντιδραστήριο **Trizol** για την απομόνωση **RNA** αγοράστηκε από την εταιρεία **Invitrogen**. Οι **random hexamer primers** και οι **αναστολείς των RNases** που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής αγοράστηκαν από την εταιρεία. Το ένζυμο **Reverse Transcriptase** που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής αγοράστηκε από την **Invitrogen**.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την απομόνωση των γονιδίων για τις απολιποπρωτεΐνες A-IV και A-II και την απομόνωση της γενωμικής αλληλουχίας της απολιποπρωτεΐνης A-I μέχρι το κωδικόνιο λήξης.

i) Οι αντιδράσεις PCR για την απομόνωση των γονιδίων apoA-IV και apoA-II από γενωμικό DNA πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl, όπου περιέχονται 100ng DNA, 50 pmol από κάθε εκκινητή (5μl από αραιώση 10pmol/μl), 5μl από 2mM συγκέντρωση δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), 3μl MgCl₂ 25mM, 1U GoTaq Polymerase και 1x του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου.

DNA template	100ng
Sense Primer (10pmole/μl)	5 μl
Antisense Primer (10pmole/μl)	5 μl
dNTPs (2mM)	5 μl
5x GoTaq buffer	10 μl
MgCl ₂ (25mM)	3 μl
DMSO	1 μl
GoTaq Polymerase	1 Unit
ddH ₂ O	X μl
<hr/>	
Total Volume	50 μl

Το πρόγραμμα PCR που ακολουθήθηκε ήταν το παρακάτω:

1. 94°C για 3 λεπτά
 2. 94°C για 1 λεπτό
 3. 58°C για 1 λεπτό
 4. 72°C για 2 λεπτά
 5. 72°C για 5 λεπτά
 6. 4°C
- } 35 κύκλοι (επαναλήψεις των σταδίων 2 έως 4)

ii) Για την απομόνωση της κωδικής αλληλουχίας της απολιποπρωτεΐνης A-I χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pCDNA3.1-aroA-Ig-ΔBglIII η οποία φέρει τη γενωμική αλληλουχία της αγρίου τύπου aroA-I.

Οι αντιδράσεις PCR για την απομόνωση της κωδικής αλληλουχίας της aroA-I από την πλασμιδιακή κατασκευή pCDNA3.1-aroA-Ig-ΔBglIII πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl, όπου περιέχονται 10ng DNA, 50 pmol από κάθε εκκινητή (5μl από αραιώση 10pmol/μl), 8μl από 2mM συγκέντρωση δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), 3μl MgCl₂ 25mM, 1U GoTaq Polymerase και 1x του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου.

DNA template	10ng
Sense Primer (10pmole/μl)	5 μl
Antisense Primer (10pmole/μl)	5 μl
dNTPs (2mM)	8 μl
5x GoTaq buffer	10 μl
MgCl ₂ (25mM)	3 μl
GoTaq Polymerase	1 Unit
ddH ₂ O	X μl
<hr/>	
Total Volume	50 μl

Το πρόγραμμα PCR που ακολουθήθηκε αναφέρεται παρακάτω:

1. 94°C για 4 λεπτά
 2. 94°C για 30 δευτερόλεπτα
 3. 60°C για 2 λεπτά
 4. 72°C για 2 λεπτά
 5. 72°C για 4 λεπτά
 6. 4°C
- } 30 κύκλοι (επαναλήψεις των σταδίων 2
εώς 4)

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων apoA-IV και apoA-II και για την κλωνοποίηση της γενωμικής αλληλουχίας της apoA-I μέχρι το κωδικόνιο λήξης.

Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων apoA-IV, apoA-II και apoA-I		
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Σκοπός
apoA-IV genomic F	5'-CCC AAG CTT TGC AGC GCA GGT GAG CTC TCC-3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' εκκινητής για την απομόνωση του γονιδίου της apoA-IV. Διακρίνεται με έντονη γραφή η θέση περιορισμού για το ένζυμο HindIII.
apoA-IV genomic R	5'-GCG GAT ATC GAG GCT AGA TTC TCA GCA GCT TTA TTG-3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' εκκινητής για την απομόνωση του γονιδίου της apoA-IV. Διακρίνεται με έντονη γραφή η θέση περιορισμού για το ένζυμο EcoRV.
apoA-IIgF	5'-CGG GGT ACC ATC CAT AGT CCC TGT CAC CTG ACA GGG G-3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' εκκινητής για την απομόνωση του γονιδίου της apoA-II. Διακρίνεται με έντονη γραφή η θέση περιορισμού για το ένζυμο KpnI.
apoA-IIgR	5'-CCC AAG CTT TGC CCA AGC TGT AGG AGA CTC TGG GTT TG-3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' εκκινητής για την απομόνωση του γονιδίου της apoA-II. Διακρίνεται με έντονη γραφή η θέση περιορισμού για το ένζυμο HindIII.
apoA-I BIO F	5'-CGC GGA TCC GAC ATA AAT AGG CCC TGC AAG AGC-3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' εκκινητής για την απομόνωση του γονιδίου της apoA-I. Διακρίνεται με έντονη γραφή η θέση περιορισμού για το ένζυμο BamHI.
apoA-I BIO R	5'-CCG GAA TTC CTG GGT GTT GAG CTT CTT AGT GTA C- 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' εκκινητής για την απομόνωση του γονιδίου της apoA-I. Διακρίνεται με έντονη γραφή η θέση περιορισμού για το ένζυμο EcoRI.

Αντίδραση σχηματισμού δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων

Για το σχηματισμό δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων αρχικά αναμιγνύουμε 10 μg από το κάθε μονόκλωνο συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο, προσθέτουμε 2μl 10x annealing buffer και συμπληρώνουμε με ddH₂O έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μl.

Οι αντιδράσεις επωάζονται για 2 λεπτά σε H₂O σε θερμοκρασία 95°C. Στη συνέχεια οι αντιδράσεις μεταφέρονται και επωάζονται στους 4°C για περίπου μία ώρα ώστε η θερμοκρασία τους να πέσει στους 29°C.

Αντίδραση φωσφορυλίωσης δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων

Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 15μl και η συνολική ποσότητα ολιγονουκλεοτιδίων που περιείχε κάθε αντίδραση ήταν περίπου 5μg. Το μίγμα της αντίδρασης εκτός του ολιγονουκλεοτιδίου περιείχε το ένζυμο T4 Polynucleotide kinase, το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και ATP. Η αντίδραση επωάζεται για 10 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια για 10 λεπτά στους 70°C ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση DNA χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% και 2%. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα: Σε κωνική φιάλη φέρονται 120ml TAE 1X και 1.2g αγαρόζη (ή 2.4g για 2% πήκτωμα). Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν η θερμοκρασία υποχωρήσει προστίθενται 5μl βρωμιούχο αιθίδιο (χρωστική που δίνει έντονο φθορίζον πορτοκαλί χρώμα όταν είναι δεσμευμένη σε DNA) και το μίγμα εκχύνεται σε κατάλληλο εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X ως ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 90-100 Volt.

Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Οι πλασμιδιακοί φορείς (vectors) και τα ενθέματα (inserts) που προκύπτουν μετά από πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφεται παραπάνω. Οι ζώνες του DNA απομονώνονται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας (νυστέρι). Ακολουθεί ο καθαρισμός του DNA με κολώνες της Promega σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας:

Στο δείγμα προστίθεται όγκος membrane binding solution, ανάλογος του τμήματος του πηκτώματος αγαρόζης που έχει απομονωθεί. Το δείγμα επωάζεται στους 55 °C μέχρι να λιώσουν τα κομμάτια της αγαρόζης. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται σε κολόνα των 2ml. Ακολουθεί επώαση για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται σε 13×10^3 rpm, για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στην κολόνα προστίθενται 700μl wash solution (με αιθανόλη). Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 13×10^3 rpm, για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται ξανά και στην κολόνα προστίθενται 500μl wash solution (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 13×10^3 rpm, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Πραγματοποιείται άλλη μία φυγοκέντρωση του δείγματος σε 13×10^3 rpm, για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη που τυχόν έχει μείνει στην κολόνα. Στη συνέχεια, στην κολόνα προστίθενται 30-50μl ddH₂O (ανάλογα την ποσότητα του DNA) για την επαναδιάλυση του δείγματος και ακολουθεί επώαση του δείγματος για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 13×10^3 rpm, για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυλασσεται στους -20 °C.

Αντιδράσεις σύνδεσης (ligation reaction)

Οι αντιδράσεις σύνδεσης πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20μl και η συνολική ποσότητα του DNA κυμαινόταν στα 200-300ng. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα, το DNA του ενθέματος, ένζυμο T4 ligase και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 16°C για 16 ώρες.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* DH10β (transformation)

Σε βακτηριολογικό σωλήνα φέρονται 100μl βακτηριακών κυττάρων DH10β (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν) και ποσότητα 20μl της αντίδρασης σύνδεσης. Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν υφίστανται θερμικό shock στους 42°C για 45 sec. Στη συνέχεια στο μίγμα προστίθενται 900μl θρεπτικό LB (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C για 1hr. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 4 min, στις 3×10^3 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Αφαιρούμε 800-850μl από το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελλέτα στον υπόλοιπο όγκο θρεπτικού. Απλώνουμε την καλλιέργεια με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου σε τρυβλίο στερεού θρεπτικού μέσου (LB-άγαρ) που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (Πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης)

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο στερεού θρεπτικού μέσου με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και καλλιεργείται σε βακτηριολογικό γυάλινο σωλήνα που περιέχει 2ml LB-αντιβιοτικό (κατάλληλο ανάλογα την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το πλασμίδιο που θέλουμε να απομονώσουμε), για 16-18 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση.

Από κάθε καλλιέργεια λαμβάνεται 1ml το οποίο φυγοκεντρείται στις 13×10^3 rpm, για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αναρροφάται με πιπέτα Pasteur και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 150μl διαλύματος P1 (resuspension buffer)+RNase A (100μg/μl). Κατόπιν προστίθενται 150μl από το διάλυμα P2 (lysis buffer) και τα δείγματα επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 150μl διαλύματος P3 (neutralization buffer) και τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13×10^3 rpm, για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωλήνες των 1.5ml όπου ο καθένας περιέχει 300μl ισοπροπανόλης (για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων). Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται στους -20°C για 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13×10^3 rpm, για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA έχει

κατακρημνιστεί ως ίζημα και το υπερκείμενο αναρροφάται με πιπέτα Pasteur. Το ίζημα ξεπλένεται με 1ml αιθανόλης 75% και φυγοκεντρείται στις 13×10^3 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αναρροφάται και πάλι με πιπέτα Pasteur και στη συνέχεια τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό. Το DNA τελικά επαναδιαλύεται σε 30-35μl αποστειρωμένου H₂O.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.

Κάθε αποικία λαμβάνεται από τρυβλίο, όπου έχει πραγματοποιηθεί streaking ή μετασχηματισμός, με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε βακτηριολογικό γυάλινο σωλήνα ο οποίος περιέχει 2ml LB-αντιβιοτικό (κατάλληλο ανάλογα την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το πλασμίδιο που θέλουμε να απομονώσουμε), για 5-6 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια η μικρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φλάσκα που περιέχει 200ml LB-αντιβιοτικό και επωάζεται για 16-18 ώρες στους 37°C.

Η καλλιέργεια κατανέμεται σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρείται σε 3300 rpm για 30min, στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 4ml διαλύματος P1 (resuspension buffer)+RNase (100μg/ml). Στη συνέχεια προστίθενται 4ml διαλύματος P2 (lysis buffer) και τα δείγματα επωάζονται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστίθενται 4ml διαλύματος P3 (neutralization buffer) και τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 10min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3300 rpm για 30min στους 4°C.

Στη συνέχεια η απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με κολόνες Qiagen (Qiagen – tip 100) βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας. Αρχικά η κολόνα εξισορροπείται προσθετόντας 4ml διαλύματος QBT (equilibration buffer). Το υπερκείμενο από τα δείγματα μεταφέρεται στην κολόνα και στη συνέχεια ξεπλένεται με 2x10ml διαλύματος QC (wash buffer). Κατόπιν η κολόνα τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα των 15ml και για την έκλυση προστίθενται 5ml QF (elution buffer). Στο δείγμα προστίθενται 3.5ml ισοπροπανόλης, αναδεύεται και μοιράζεται ισότιμα σε σωλήνες των 1.5ml και φυγοκεντρείται σε 13×10^3 rpm για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA κατακρημνίζεται και πέφτει σαν ίζημα και το υπερκείμενο αφαιρείται. Στο ίζημα προστίθεται 1ml αιθανόλη 75% και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13×10^3 rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την

αναρρόφηση της αιθανόλης τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) ή αποστειρωμένου H₂O. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 260nm (UV) και η ποιότητά του εκτιμάται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Western Blot)

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12.5% όσον αφορά το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel). [Stacking gel: ddH₂O 3.6ml, 30% acrylamide 0.9ml, stacking buffer (Tris 0.5M, SDS 0.4%, pH 6.8) 1.5ml, 10% APS 60μl, TEMED 3μl. Running gel: ddH₂O 3.2ml, 30% acrylamide 4.2ml, running (separating) buffer 2.5ml, 10% APS 160μl, TEMED 8μl].

Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 500ml διαλύματος TGS 1x (1L 10x TGS: 30.3gr Tris, 144.2gr Glycine, 10gr SDS, pH 8.3), στα 150 Volt σε συσκευή Bio-Rad Protean Electroblood.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε συσκευή Bio-Rad Protean Electroblood σε 1L διαλύματος μεταφοράς (1L transfer buffer: ddH₂O 700ml, μεθανόλη 200ml, 10x TGS 100ml), με ηλεκτροφόρηση στα 50 Volt για περίπου 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την περάτωση της μεταφοράς ακολουθεί χρώση της μεμβράνης με χρωστική Poinceau, για μια πρώτη εικόνα των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια οι μεμβράνες εκπλένονται με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20], [1L 10x TBS: 90 gr NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH 7.3] για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι μη ειδικές θέσης πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με 3 διαδοχικές εκπλύσεις των μεμβρανών με διάλυμα blocking buffer [1x TBS-T, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα], σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το κατάλληλο πρωτεΐν αντισώμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, διαλυμένο σε κατάλληλη αραιώση σε blocking buffer. Ακολούθως οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές επί 10 λεπτά με διάλυμα TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το κατάλληλο

δευτερεύον αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση σε blocking buffer. Το δευτερεύον αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτεύον αντίσωμα και φέρει συνδεδεμένο το ένζυμο horse radish peroxidase (HRP). Έπειτα οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές επί 10 λεπτά με διάλυμα TBS-T και μία φορά για 5 λεπτά με διάλυμα TBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και εκθέτοντας τις μεμβράνες φιλμ για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για την ανίχνευση βιοτινυλίωσης (Streptavidin-HRP conjugated antibody) το πρωτόκολλο διαφοροποιείται μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ως εξής: οι μεμβράνες εκπλένονται με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.1% Tween-20] για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης μπλοκάρονται με 3 διαδοχικές εκπλύσεις των μεμβρανών με διάλυμα blocking buffer [1x TBS-T, 3% ημιαποβουτηρωμένο γάλα], σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το αντίσωμα ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης στρεπταβιδίνης-βιοτίνης διαλυμένο σε κατάλληλη αραιώση (1:10000) σε blocking buffer. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές επί 10 λεπτά με διάλυμα TBS-T και μία φορά για 5 λεπτά με διάλυμα TBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται όπως έχουμε περιγράψει παραπάνω.

Οι μεμβράνες επαναχρησιμοποιούνται για ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping. Οι μεμβράνες επωάζονται υπό γρήγορη ανάδευση με κατάλληλο διάλυμα [stripping buffer: 1% SDS, 1% Triton X-100, 25mM Glycine] για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν εκπλύσεις των μεμβρανών και επώσεις με τα κατάλληλα αντισώματα όπως περιγράφεται παραπάνω.

Κυτταροκαλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HEK 293T (human embryonic kidney cells) και 911 (human embryonic retinoblasts). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75cm² ή 175cm² και σε τρυβλία 6-well, p-60 και p-100 (διαμέτρου 6, 60 και 100mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα θερμοκρασίας 37°C και σε συνθήκες 5% CO₂. Αποθέματα καλλιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε

θερμοκρασία -80°C θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 10% DMSO.

Τα κυτταρικά δείγματα που προέρχονται από αποθέματα καλλιιεργειών εμβαπτιζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM συμπληρωμένο με 10% FBS και 1% αντιβιοτικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα. Το θρεπτικό μέσο στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48-72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν πλήρη (confluent) μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (Trypsin-EDTA) και στην επιθυμητή συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου.

Παροδικές επιμόλυνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)

Οι παροδικές επιμόλυνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ με τα εκάστοτε κατάλληλα πλασμίδια. Τα κύτταρα της σειράς HEK 293T αραιώνονται σε 5×10^5 κύτταρα ανά τρυβλίο p60 και σε 1×10^6 κύτταρα ανά τρυβλίο p100, την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα μετρώνται σε αιμοκυττόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific.

Για την παροδική επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p60 (για τον έλεγχο της έκφρασης των κατασκευών που πραγματοποιήθηκαν), παρασκευάζεται μίγμα που περιέχει μέχρι 15 μg πλασμιδίου έκφρασης, 15.5 μl CaCl_2 2M και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 125 μl .

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p100 (για τη δοκιμασία ανίχνευσης της βιοτινυλίωσης της apoA-I), παρασκευάζεται μίγμα που περιέχει 15/20 μg πλασμιδίου έκφρασης που φέρει το γονίδιο της BirA ή πλασμιδίου συμπλήρωσης (Salmon Sperm DNA) και 15 μg πλασμιδίου έκφρασης pcDNA3-Bio-C-apoA-I, 31 μl CaCl_2 2M και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl . Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 30 μg .

Σε κάθε περίπτωση, το μίγμα προστίθεται στάγδην σε ίσο όγκο HEPES Buffered Saline (HBS) 2x [2x HBS: 42mM HEPES pH 7.1, 274mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12mM dextrose] και ακολουθεί ανάδευση. Το διάλυμα επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 7-17 ώρες, αλλαγή θρεπτικού μέσου των κυττάρων και επώαση στους 37°C για άλλες 24 ώρες.

Συλλογή κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνικών δειγμάτων

Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μετά από παροδική επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T σε τρυβλία p-100 με τα πλασμίδια έκφρασης pSec-Tag-2B – BirA (για την έκφραση εκκρινόμενης μορφής της BirA) και pcDNA3-BioC – apoA-I (για την έκφραση της apoA-I σε σύντηξη με ένα biotin acceptor domain στο καρβοξυτελικό της άκρο).

Τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και συλλέγονται σε 1ml διαλύματος PBS. Αποκολλώνται από το τρυβλίο με ξύστρο και οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση σε 5×10^3 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150μl CoIP lysis buffer [20mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100] στο οποίο έχουν προστεθεί σε κατάλληλη αναλογία αναστολείς πρωτεασών (1mM PMSF, 0.5mM Benzamide). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων υπό ανάδευση για 30 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε 13×10^3 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους -80°C.

Συλλογή θρεπτικού μέσου από κύτταρα θηλαστικών και επώαση με streptavidin beads

Η συλλογή του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε μετά από παροδική επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T σε τρυβλία p-100 με τα πλασμίδια έκφρασης pSec-Tag-2B – BirA (για την έκφραση εκκρινόμενης μορφής της BirA) και pcDNA3-BioC – apoA-I (για την έκφραση της apoA-I σε σύντηξη με ένα biotin acceptor domain στο καρβοξυτελικό της άκρο).

Το θρεπτικό μέσο συλλέγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 2ml και σε κάθε δείγμα προστίθενται 20μl εξισορροπημένα Streptavidin beads. Τα δείγματα επωάζονται υπό ανάδευση overnight στους 4°C.

Την επόμενη μέρα τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε 2000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και προστίθεται σε κάθε δείγμα 1ml CoIP lysis buffer. Ακολουθεί μία δεύτερη φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 2000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και σε κάθε δείγμα προστίθενται 15μl 4x loading buffer. Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων στους

100°C για 10 λεπτά και ανάλυση των δειγμάτων κατά Western όπως έχουμε ήδη περιγράψει παραπάνω.

Εξισορρόπηση των σφαιριδίων στρεπταβιδίνης (streptavidin beads)

Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 1.5ml προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα σφαιριδίων και πραγματοποιούνται τρία πλύσιμα με 1ml PBS 1x. Μετά από κάθε πλύσιμο, τα σφαιρίδια φυγοκεντρώνται σε 2×10^3 rpm για 3 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και προστίθεται φρέσκο PBS 1x. Μετά το τελευταίο πλύσιμο προστίθεται όγκος φρέσκου PBS 1x ίσος με τον όγκο των σφαιριδίων στο σωλήνα ώστε το τελικό διάλυμα να περιέχει 50% σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Τα εξισορροπημένα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης διατηρούνται στους 4°C.

Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της έκφρασης (παραγωγή mRNA) για τις κατασκευές pcDNA3-aroA-IV, pAd-Track-CMV-aroA-IV και pAd-Track-aroA-II.

Η συλλογή των κυττάρων και η διαδικασία εξαγωγής του RNA πραγματοποιήθηκε μετά από παροδική επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T σε τρυβλία p-60 όπως έχουμε ήδη περιγράψει με τα πλασμίδια έκφρασης που αναφέρονται παραπάνω.

Η διαδικασία συλλογής των κυττάρων ξεκινάει με την αφαίρεση του θρεπτικού, ακολουθεί ένα πλύσιμο με 1x PBS και τέλος προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Trizol ανα δείγμα. Τα κύτταρα με τη χρήση πιπέτας ομογενοποιούνται, συλλέγονται και μεταφέρονται σε σωλήνες των 2ml. Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 200μl CHCl_3 και ακολουθεί vortex (~ 10 sec) μέχρι τα δείγματα να γίνουν ομοιογενή. Έπειτα, τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12×10^3 rpm, για 15 λεπτά στους 4°C. Στα δείγματα σχηματίζονται δύο φάσεις και η υδατική (πάνω) φάση μεταφέρεται σε σωλήνες των 1.5ml. Προσθέτουμε 500μl ισοπροπανόλη και αναδεύουμε. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12×10^3 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθεται 1ml 75% αιθανόλη.

Ακολουθεί vortex και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 12×10^3 rpm για 15 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό. Ακολουθεί επαναδιάλυση των δειγμάτων σε κατάλληλο όγκο ddH₂O (30-50μl) με ελαφριά ανακίνηση.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA στα δείγματά μας γίνεται φωτομέτρηση στα 260nm και ο υπολογισμός πραγματοποιείται με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου: $\mu\text{g}/\mu\text{l RNA} = (\text{OD}_{260} \times 40 \times 200) / 1000$.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για τη δημιουργία cDNA. Για κάθε δείγμα RNA ετοιμάζεται η παρακάτω αντίδραση για τη δημιουργία cDNA:

RNA (200ng/μl)	5 μl
Random examer primers (100ng/μl)	3 μl
dNTPs 2mM	5 μl
ddH ₂ O	20.5 μl

Στη συνέχεια η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

1. 65°C για 5 λεπτά
2. PAUSE – Προσθήκη 10μl 5x First strand buffer και 5μl DTT ανά δείγμα
3. 25°C για 2 λεπτά
4. PAUSE – Προσθήκη 1μl Reverse Transcriptase και 0.5μl RNase OUT ανά δείγμα
5. 25°C για 10 λεπτά
6. 42°C για 50 λεπτά
7. 70°C για 15 λεπτά
8. 4°C (Τέλος)

Τα cDNA που παράγονται από την παραπάνω αντίδραση, χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση αντιδράσεων PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, οι οποίοι αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής	
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
apoA-IV-cDNA F	5'-TCC AGT GTG GCA AGA AAC TCC TCC AGC C-3'
apoA-IV-cDNA R	5'-AGC TCT CGC AGG TTG TCC CCG ATC TTC-3'
apoA-II-cDNA F	5'-GAG CTT TGG TTC GGA GAC AG-3'
apoA-II-cDNA R	5'-GCA AAG AGT GGG TAG GGA CA-3'
GAPDH F	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
GAPDH R	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων αντιδράσεων PCR ήταν το παρακάτω:

- | | |
|-----------------------------|---|
| 1. 94°C για 4 λεπτά | } 30 κύκλοι (επαναλήψεις των σταδίων 2 έως 4) |
| 2. 94°C για 30 δευτερόλεπτα | |
| 3. 57°C για 2 λεπτά | |
| 4. 72°C για 2 λεπτά | |
| 5. 72°C για 4 λεπτά | |
| 6. 4°C | |

Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊκοί φορείς για καθεμία από τις κατασκευές που πραγματοποιήθηκαν (pAd-Track-CMV-apoA-IV και pAd-Track-CMV-apoA-II) επώαστηκαν με το περιοριστικό ένζυμο PacI για να γίνουν γραμμικά μόρια. 10μg DNA χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση κυττάρων 911. Για τη διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο LipofectaminTM 2000 της Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα επώάζονται στους 37°C. Δέκα με δώδεκα ημέρες μετά τη διαμόλυνση, τα ιικά σωματίδια που παράγονται προκαλούν λύση των κυττάρων. Το λύμα συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη

μόλυνση μιας μεγάλης καλλιέργειας κυττάρων 911 σε φλάσκα 175cm² και μιας μικρής καλλιέργειας κυττάρων 911 σε τρυβλίο p-60 (control για την έκφραση GFP). Πριν τη μόλυνση τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM συμπληρωμένο με 2% HHS (Heat Inactivated Horse Serum) και 1% αντιβιοτικό. Την επόμενη μέρα από τη μόλυνση, με τη βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου ελέγχουμε την έκφραση GFP στο τρυβλίο p-60 που έχουμε μολύνει. Δύο με τρεις ημέρες μετά τη μόλυνση, τα κύτταρα της μεγάλης καλλιέργειας λύνονται και το λύμα συλλέγεται και διατηρείται στους -80 °C. Το λύμα στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την μόλυνση τεσσάρων μεγάλων καλλιέργειών κυττάρων 911 σε φλάσκες 175cm². Και πάλι, πριν τη μόλυνση τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM συμπληρωμένο με 2% HHS (Heat Inactivated Horse Serum) και 1% αντιβιοτικό. Με τη μόλυνση μεγάλων καλλιέργειών κυττάρων 911 επιτυγχάνουμε την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανασυνδυασμένων αδενοϊών. Αυτή τη φορά τα κύτταρα συλλέγονται πριν επέλθει η λύση τους, στη φάση της παραγωγής των ανασυνδυασμένων αδενοϊών.

Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν φυγοκεντρώνται σε 1500 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο (θρεπτικό μέσο) απομακρύνεται. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1ml πλήρους θρεπτικού μέσου με 2% HHS και 1% αντιβιοτικό και διατηρείται στους -80°C. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις κύκλοι ψύξης/απόψυξης (-80°C / 37°C) στο ίζημα ώστε να λυθούν τα κύτταρα και να απελευθερωθούν τα ιικά σωματίδια. Ακολουθεί μία φυγοκέντρωση σε 3500 rpm για 10 λεπτά στους 4°C για το διαχωρισμό του υπερκείμενου διαλύματος που περιέχει τα ιικά σωματίδια από τα σπασμένα κύτταρα που σχηματίζουν ίζημα. Το διάλυμα των αδενοϊών που προκύπτει από τη φυγοκέντρωση χωρίζεται σε μικρούς όγκους (aliquots) σε μικροδοχεία υπερκαταψύκτη (cryovials) και διατηρείται στους -80°C. Μετά την απομόνωση των αδενοϊικών σωματιδίων ακολούθησε η τιτλοδότηση του ιού μέσω της δοκιμασίας σχηματισμού πλακών μόλυνσης (plaque assay).

Δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών (plaque assay)

Κύτταρα της σειράς 911 σε πλήρη ανάπτυξη σε μονοστιβάδα σε 6-well μολύνονται με διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων αδενοϊών. Συγκεκριμένα, οι αδενοϊοί

αραιώθηκαν 5×10^5 ως και 5×10^7 φορές σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM συμπληρωμένο με 2% HHS και 1% αντιβιοτικό.

Τα κύτταρα έχουν αραιωθεί σε 1×10^6 κύτταρα ανά well την προηγούμενη μέρα της μόλυνσης. Το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και προστίθεται 1ml διαλύματος κατάλληλης αραιώσης αδενοϊού. Τα κύτταρα επωάζονται για 15 λεπτά στο διάλυμα του αδενοϊού. Στη συνέχεια το διάλυμα αφαιρείται και τα κύτταρα σταθεροποιούνται στο δοχείο καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο [2x MEM, 4% Heat Inactivated Horse Serum (HHS) και 25mM MgCl₂] αραιωμένο με διάλυμα άγαρ [1,5% άγαρ, 40 mM HEPES, pH: 7,4] που στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα επωάζονται για 10-12 ημέρες στους 37°C. Οι αδενοϊοί που κατασκευάστηκαν κατά την παρούσα μελέτη εκφράζουν παράλληλα και την πρωτεΐνη GFP, έτσι οι πλάκες μόλυνσης/λύσης εντοπίστηκαν με τη βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου. Οι πλάκες που σχηματίστηκαν από κάθε διαφορετική αραιώση του αδενοϊού μετρώνται για τον υπολογισμό του τίτλου του αδενοϊού (της συγκέντρωσης των αδενοϊικών σωματιδίων κάθε αδενοϊικής κατασκευής).

Τιτλοδότηση μέσω της καταμέτρησης μεμονωμένων κυττάρων που εκφράζουν GFP μετά από μόλυνση με συγκεκριμένες αραιώσεις του αδενοϊού

Κύτταρα της σειράς 911 σε πλήρη ανάπτυξη σε μονοστιβάδα σε six-well μολύνονται με διαδοχικές αραιώσεις του ανασυνδυασμένου αδενοϊού. Συγκεκριμένα, ο αδενοϊός αραιώθηκε και πάλι 5×10^5 ως και 5×10^7 φορές σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM συμπληρωμένο με 2% HHS και 1% αντιβιοτικό.

Την προηγούμενη μέρα της μόλυνσης, τρία wells καλύπτονται με 1ml κολλαγόνο αραιωμένο σε 1x PBS σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml. 30 λεπτά αργότερα, το κολλαγόνο απομακρύνεται και τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, κύτταρα 911 αραιώνονται σε 1×10^6 κύτταρα ανά well και ο συνολικός όγκος θρεπτικού σε κάθε τρυβλίο συμπληρώνεται μέχρι τα 2ml.

Την επόμενη μέρα, αφαιρείται από κάθε well 1.5ml θρεπτικού και προστίθεται 1ml της κατάλληλης αραιώσης του ιού. Τα κύτταρα επωάζονται για 2 ώρες στους 37°C στο διάλυμα του αδενοϊού. Στη συνέχεια το διάλυμα αφαιρείται και πραγματοποιείται ένα πλύσιμο των κυττάρων με πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM συμπληρωμένο με 2% FBS και 1% αντιβιοτικό. Το θρεπτικό αυτό αφαιρείται και σε κάθε τρυβλίο

προστίθενται 2ml φρέσκου θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 48 ώρες.

Μετά το πέρας της 48ωρης επώασης, το θρεπτικό αφαιρείται και τα κύτταρα εκπλένονται με PBS 1x. Το PBS αφαιρείται και τα τρυβλία αφήνονται για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια σε κάθε τρυβλίο προστίθεται 1ml 4% Paraformaldehyde και τα κύτταρα επωάζονται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με PBS 1x και τελικό σε κάθε τρυβλίο προστίθεται 1ml φρέσκου διαλύματος PBS 1x. Καθώς όπως έχουμε ήδη αναφέρει, οι αδενοϊοί που κατασκευάστηκαν κατά την παρούσα μελέτη εκφράζουν και την πρωτεΐνη GFP, ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων που εκφράζουν την GFP με τη βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου για τον προσδιορισμό του τίτλου του ιού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ A-IV & A-II

Κλωνοποίηση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης A-IV του ανθρώπου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ρόλος της apoA-IV *in vivo* δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Από τη μέχρι σήμερα έρευνα σχετικά με την συγκεκριμένη απολιποπρωτεΐνη, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την προστατευτική της δράση ενάντια στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών κυρίως μέσω της εμπλοκής της στο μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. Στόχος είναι η δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την ανθρώπινη apoA-IV και θα χρησιμοποιηθεί για την *in vivo* μελέτη της δράσης της apoA-IV.

Για την δημιουργία του ανασυνδυασμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την ανθρώπινη απολιποπρωτεΐνη A-IV αρχικά ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση της γενωμικής αλληλουχίας του γονιδίου της. Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση την καταχωρημένη στην Genbank νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης apoA-IV (Accession # NC 000011).

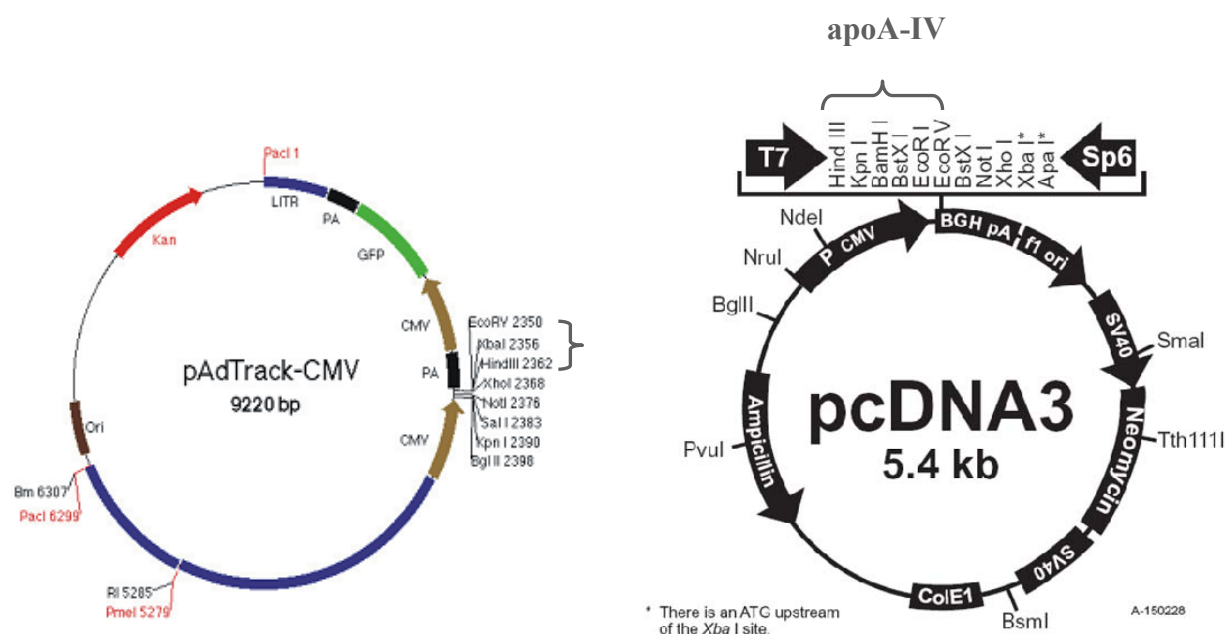
Ο εκκινητής “apoA-IV genomic F” αναγνωρίζει την περιοχή στην αρχή του πρώτου εξωνίου του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης apoA-IV, ενώ σχεδιάστηκε ώστε να φέρει και την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Ο εκκινητής “apoA-IV genomic R” αναγνωρίζει το τέλος της αλληλουχίας του τρίτου και τελευταίου εξωνίου του γονιδίου που μας ενδιαφέρει και επιπλέον σχεδιάστηκε ώστε να φέρει και την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο EcoRV.

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο γενωμικό DNA απομονωμένο από κύτταρα της σειράς HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cells).

Το προϊόν που προέκυψε από την αντίδραση υπεβλήθει σε διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και EcoRV και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στα πλασμίδια pCDNA3 και pAd-Track-CMV οι χάρτες των οποίων παρατίθενται παρακάτω. Ο πλασμιδιακός φορέας pAd-Track-CMV όπως θα δούμε και παρακάτω χρησιμοποιείται για τη κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών και στην προκειμένη περίπτωση, η πλασμιδιακή κατασκευή pAd-Track-CMV-apoA-IV θα χρησιμοποιηθεί

για την κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την apoA-IV σύμφωνα με το σύστημα κατασκευής Ad-easyTM της Stratagene.

Στην Εικόνα 3 παρατίθενται οι χάρτες των πλασμιδιακών κατασκευών που πραγματοποιήθηκαν.



Εικ.3: Χάρτες των πλασμιδιακών φορέων pcDNA3 (Invitrogen) και pAd-Track-CMV. Μεταξύ των θέσεων περιορισμού HindIII και EcoRV σε κάθε φορέα κλωνοποιήθηκε η γενωμική αλληλουχία του γονιδίου της apoA-IV. Η πλασμιδιακή κατασκευή pAd-Track-CMV-apoA-IV θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την apoA-IV.

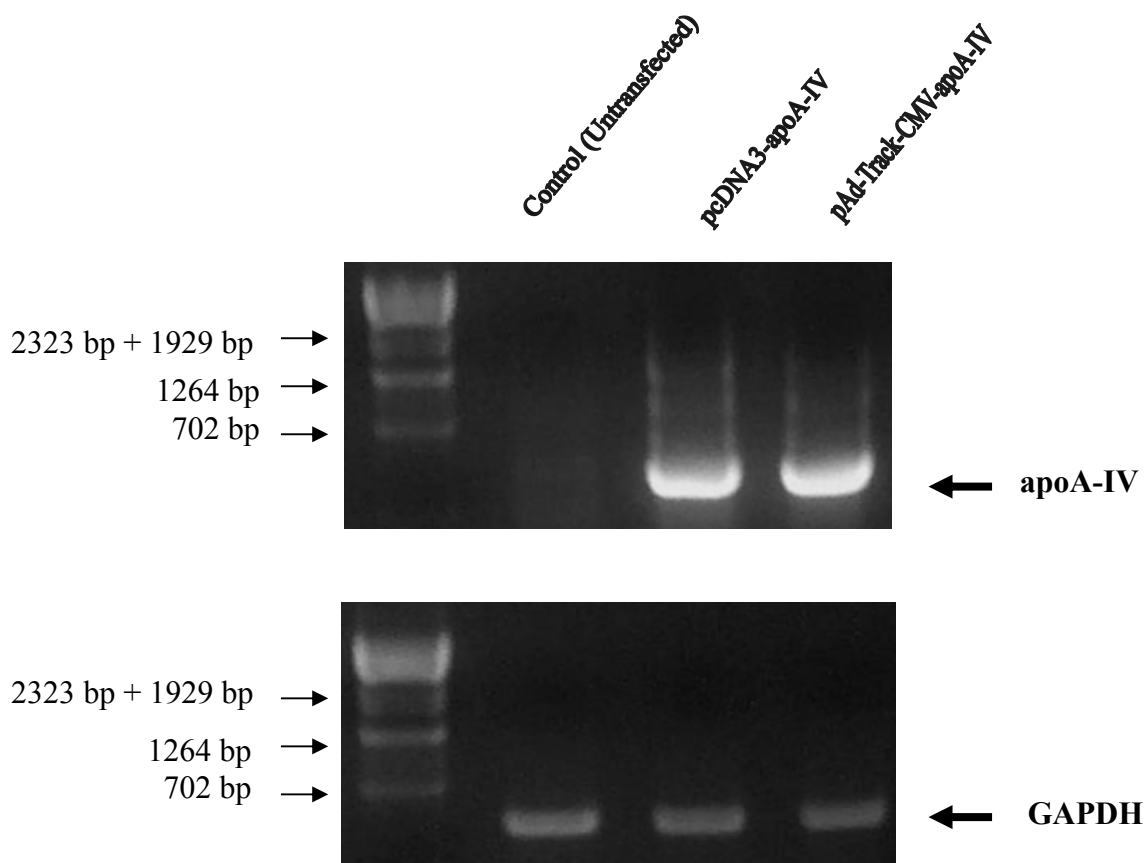
Έλεγχος της έκφρασης των κατασκευών pcDNA3-apoA-IV και pAd-Track-CMV-apoA-IV

Η έκφραση του γονιδίου της ανθρώπινης apoA-IV που κλωνοποιήθηκε στις παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές μελετήθηκε στην κυτταρική σειρά HEK 293 T, η οποία δεν εκφράζει ενδογενώς την apoA-IV.

Ο έλεγχος της έκφρασης των κατασκευών πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της PCR-αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια έκφρασης pcDNA3-apoA-IV και pAd-Track-CMV-apoA-IV και το RNA που συλλέχθηκε από αυτά τέθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Τα cDNA που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση αντίδρασης

PCR με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της apoA-IV του ανθρώπου. Ως μάρτυρας της ισοδύναμης σύνθεσης cDNA χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3'-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) λόγω της συστατικής έκφρασής του.

Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR αντίστροφης μεταγραφής που πραγματοποιήθηκαν:



Εικ. 4: Έλεγχος της έκφρασης των πλασμιδιακών κατασκευών pcDNA3-apoA-IV και pAd-Track-CMV-apoA-IV. Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν με τις παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίστροφης μεταγραφής με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του apoA-IV γονιδίου του ανθρώπου για να ελεγχθεί η έκφραση των δύο κατασκευών. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 435 ζεύγη βάσεων.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, οι δύο πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3-apoA-IV και pAd-Track-CMV-apoA-IV εκφράζονται φυσιολογικά. Το πλασμιδιοφορέας pAd-Track-CMV-apoA-IV χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την apoA-IV.

Κλωνοποίηση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης A-II του ανθρώπου.

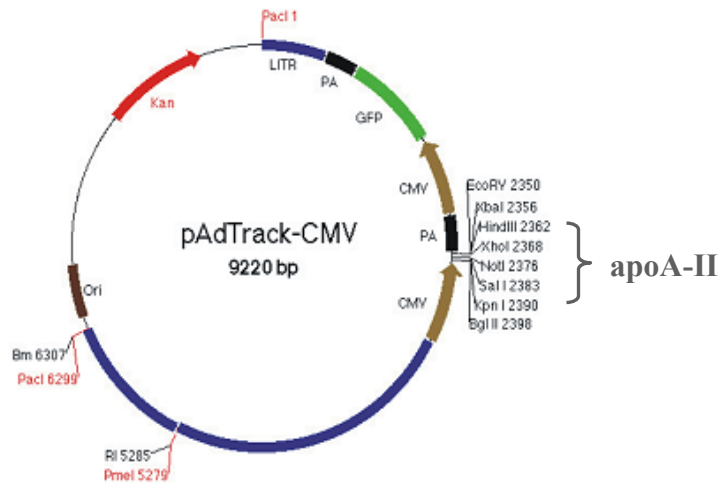
Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα ΕΙΣΑΓΩΓΗ, η απολιποπρωτεΐνη A-II είναι η δεύτερη σε αφθονία απολιποπρωτεΐνη στα σωματίδια HDL μετά την apoA-I. Ωστόσο σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, σε αντίθεση με τις απολιποπρωτεΐνες A-I και A-IV η apoA-II φαίνεται να παρεμποδίζει την εύρυθμη λειτουργία του μονοπατιού αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης με αποτέλεσμα την εμφάνιση αθηρωμάτωσης. Η δημιουργία ενός ανασυνδυσμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την ανθρώπινη apoA-II θα δώσει τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης της δράσης της apoA-II *in vivo* με το σύστημα της γονιδιακής μεταφοράς σε ζώα με χρήση ανασυνδυσμένων αδενοϊών.

Το πρώτο βήμα για τη δημιουργία του ανασυνδυσμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την apoA-II ήταν η κλωνοποίηση της γενωμικής αλληλουχίας της συγκεκριμένης απολιποπρωτεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα pAd-Track-CMV.

Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με βάση την καταχωρημένη στην Genbank νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης apoA-II (Accession # X02619).

Ο εκκινητής “apoA-IIgF” αναγνωρίζει τμήμα αλληλουχίας πριν την αρχή του 1^{ου} εξωνίου (δηλ. ανοδικά της γενωμικής αλληλουχίας του γονιδίου της apoA-II). Επίσης σχεδιάστηκε ώστε να φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο KpnI. Ο εκκινητής “apoA-IIgR” αναγνωρίζει μία αλληλουχία 176 βάσεις μετά το τέλος της γενωμικής αλληλουχίας του γονιδίου apoA-II και φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Ως εκμαγείο για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA απομονωμένο από κύτταρα της σειράς HepG2.

Το προϊόν που προέκυψε από την αντίδραση PCR υπεβλήθει σε διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού KpnI και HindIII και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pAd-Track-CMV προκειμένου να κατασκευαστεί στη συνέχεια ανασυνδυσμένος αδενοϊός που εκφράζει την apoA-II.

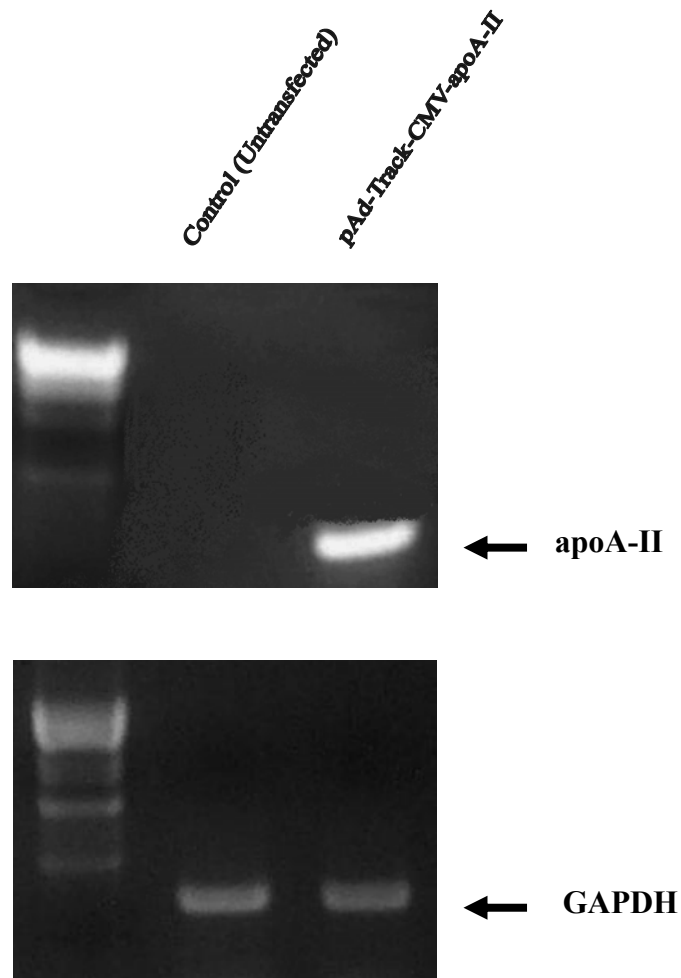


Εικ. 5: Χάρτης της πλασμιδιακής κατασκευής pAd-Track-CMV-apoA-II. Μεταξύ των θέσεων περιορισμού KpnI και HindIII του πλασμιδιακού φορέα pAd-Track-CMV κλωνοποιήθηκε η γενωμική αλληλουχία του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης A-II. Η πλασμιδιακή κατασκευή pAd-Track-CMV-apoA-II θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την apoA-II.

Έλεγχος της έκφρασης της κατασκευής pAd-Track-CMV-apoA-II

Η έκφραση της πλασμιδιακής κατασκευής pAd-Track-CMV-apoA-II ελέγχθηκε σε κύτταρα της σειράς HEK 293 T τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς την απολιποπρωτεΐνη A-II, μέσω της διαδικασίας της PCR-αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Κύτταρα της σειράς HEK 293 T επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο έκφρασης pAd-Track-CMV-apoA-II και το RNA που συλλέχθηκε από αυτά τέθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Τα cDNA που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της apoA-II. Ως γονίδιο ελέγχου της ισοδύναμης σύνθεσης cDNA χρησιμοποιήθηκε η αφυδρογονάση της 3'-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH).

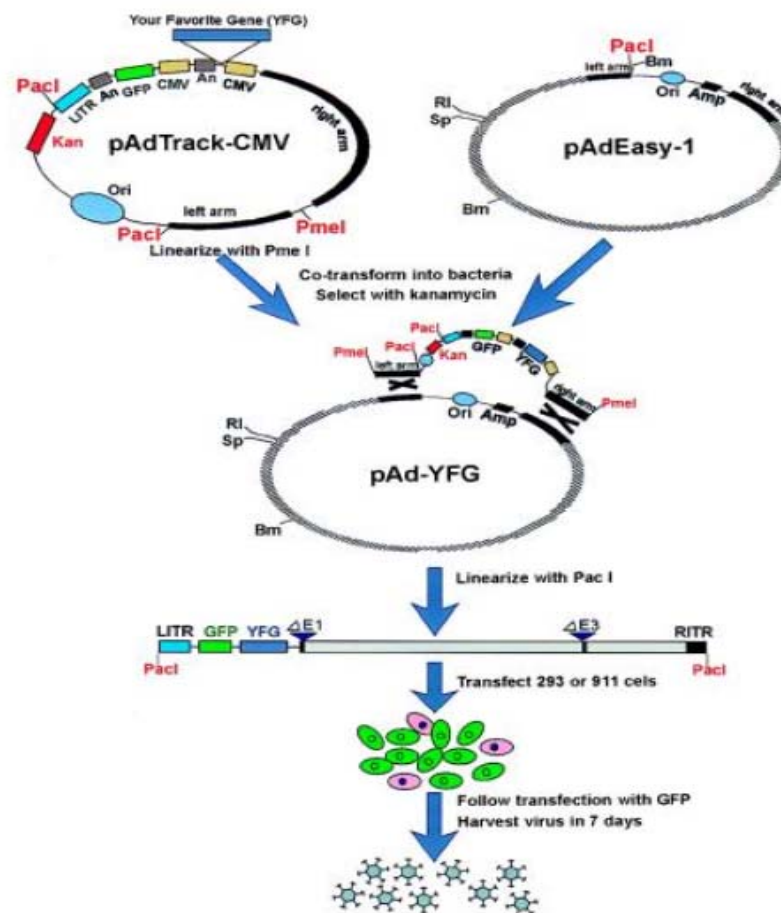


Εικ. 6: Έλεγχος της έκφρασης της πλασμιδιακής κατασκευής pAd-Track-CMV-apoA-II. Κύτταρα HEK 293 T επιμολύνθηκαν με την παραπάνω πλασμιδιακή κατασκευή και ακολούθησε απομόνωση του RNA. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίστροφης μεταγραφής με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του apoA-II γονιδίου για να ελεγχθεί η έκφραση της κατασκευής. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 339 ζεύγη βάσεων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 6, τα κύτταρα HEK 293T που επιμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή pAd-Track-CMV-apoA-II εκφράζουν την apoA-II σε φυσιολογικά επίπεδα. Στη συνέχεια η συγκεκριμένη κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου αδενοϊού που θα εκφράζει την απολιποπρωτεΐνη A-II του ανθρώπου.

Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν τις απολιποπρωτεΐνες A-IV και A-II του ανθρώπου

Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, ο πλασμιδιακός φορέας pAd-Track-CMV φέρει το γονίδιο για την GFP (Green Fluorescent Protein) που θα επιτρέψει την ευκολότερη ανίχνευση των παραγόμενων αδενοϊών. Εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης (polylinker) φέρει αδενοϊκές αλληλουχίες (left and right arm) για την επίτευξη ομόλογου ανασυνδυασμού με το πλασμίδιο pAd-Easy-1 το οποίο φέρει την πλειονότητα των γονιδίων (εκτός των γονιδίων E1 και E5) που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του αδενοϊού τύπου 5.

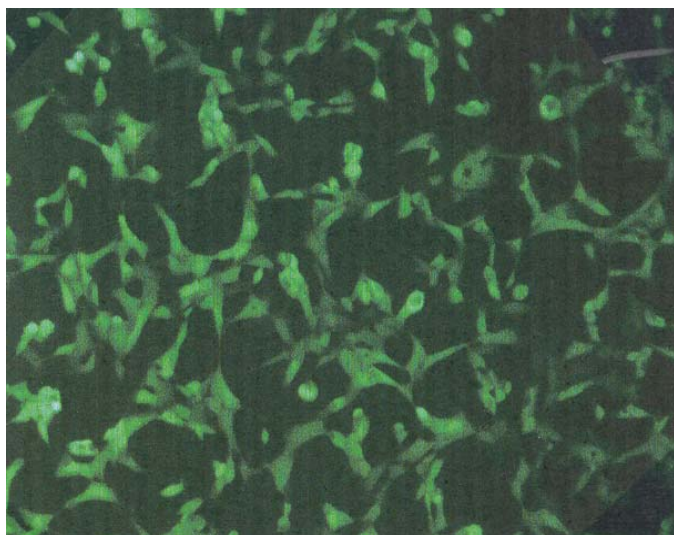


Εικ. 7: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος κατασκευής ανασυνδυασμένων αδενοϊών Ad-EasyTM Adenoviral vector system της Stratagene.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η κατασκευή των πλασμιδίων-φορέων pAd-Track-CMV-αροA-IV και pAd-Track-CMV-αροA-II και στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μετασχηματισμό των κατάλληλων βακτηρίων BJ5183-AD1 με τα παραπάνω

πλασμίδια-φορείς σε γραμμική μορφή μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PmeI. Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος φέρει το πλασμίδιο pAd-Easy-1 αλλά και κατάλληλα ένζυμα που επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό μορίων DNA. Για την επιλογή των κλώνων που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκε μία πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PacI, η οποία αν ο ανασυνδυασμός έχει συμβεί θα δώσει μία ζώνη 3kb ή 4.5kb ενδεικτικό του επιτυχούς ανασυνδυασμού.

Για τη δημιουργία των αδενοϊών που εκφράζουν τις απολιποπρωτεΐνες apoA-IV και apoA-II, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση ποσότητας 15μg για καθένα από τα πλασμίδια pAd-GFP-apoA-IV και pAd-GFP-apoA-II σε γραμμική μορφή, μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο PacI σε κύτταρα 911 αραιωμένα σε τρυβλία p100. Η ανίχνευση των παραγόμενων αδενοϊών σε κάθε στάδιο πολλαπλασιασμού τους πραγματοποιήθηκε μέσω της ανίχνευσης έκφρασης της GFP στα κύτταρα που είχαν μολυνθεί (Εικ.8).



Εικ. 8: Κύτταρα 911 που εκφράζουν τον αδενοϊό pAd-GFP-apoA-IV. Η ανίχνευση του ιού γίνεται μέσω της έκφρασης της GFP. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζουν κύτταρα 911 που εκφράζουν τον αδενοϊό pAd-GFP-apoA-II.

Για την εκτίμηση του τίτλου του αδενοϊού που εκφράζει την apoA-IV πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών (plaque assay) σε κύτταρα 911 όπως περιγράφεται στην ενότητα ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ. Ανάλογα με τον αριθμό των μολυσματικών πλακών που σχηματίστηκαν στη μονοστιβάδα των κυττάρων υπολογίστηκε ο αριθμός μολυσματικών σωματιδίων (plaque forming units – pfu) ανά ml αδενοϊικού διαλύματος.

Για την εκτίμηση του τίτλου του αδενοϊού που εκφράζει την apoA-II πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία της «γρήγορης τιτλοδότησης» μέσω της

καταμέτρησης κυττάρων που εκφράζουν της GFP μετά από μόλυνση με τον αδενοϊό όπως περιγράφεται στην ενότητα ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ. Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυττάρων που εκφράζουν την GFP με τη βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου και με τους κατάλληλους υπολογισμούς εκτιμήθηκε ο τίτλος του συγκεκριμένου αδενοϊού.

Στον Πίνακα 4 φαίνονται τα αποτελέσματα της τιτλοδότησης των δύο αδενοϊών που κατασκευάστηκαν.

Πίνακας 4: Τιτλοδότηση των ανασυνδυασμένων αδενοϊών που κατασκευάστηκαν.	
<i>Ανασυνδυασμένος αδενοϊός</i>	<i>Τίτλος (pfu/ml)</i>
Ad-GFP-apoA-IVwt	1.3×10^5
Ad-GFP-apoA-IIwt	1.8×10^6

Οι παραπάνω αδενοϊοί κατασκευάστηκαν για την *in vivo* και *in vitro* μελέτη της δράσης των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών. Οι συγκεκριμένοι αδενοϊοί θα χρησιμοποιηθούν για γονιδιακή μεταφορά σε κατάλληλα μοντέλα ζώων και στη συνέχεια θα πραγματοποιηθούν αναλύσεις για να εκτιμηθεί το πώς επιδρά η έκφραση των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών στο λιποπρωτεϊνικό προφίλ των ζώων αυτών.

ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ A-I

Δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA3-BIO-C

Σκοπός του δεύτερου μέρους αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η δημιουργία μιας μορφής της apoA-I που να μπορεί να βιοτινυλιωθεί *in vivo*. Η βιοτινυλιωμένη μορφή της apoA-I θα μπορούσε στη συνέχεια να απομονωθεί από το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιεργειών ή το πλάσμα πειραματοζώων χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης-αγαρόζης. Αρχικά προχωρήσαμε στη δημιουργία ενός πλασμιδιακού φορέα που έφερε μέσα στην αλληλουχία του μία αλληλουχία αμινοξέων που μπορεί να βιοτινυλιωθεί από την λιγάση βιοτίνης BirA (biotin-acceptor domain). Η συγκεκριμένη αλληλουχία εντέθηκε με τέτοιο τρόπο στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3 ώστε τα γονίδια που θα κλωνοποιηθούν στο συγκεκριμένο φορέα να μπουν σε σύντηξη με αυτήν και οι πρωτεΐνες που θα προκύψουν από την έκφραση των συγκεκριμένων κατασκευών να φέρουν σε σύντηξη με το καρβοξυτελικό τους άκρο την αμινοξική αλληλουχία που μπορεί να βιοτινυλιωθεί. Με τον τρόπο αυτό έχουμε τη δυνατότητα να βιοτινυλιώσουμε πρωτεΐνες όπως η apoA-I που υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η αποκοπή ενός προ-πεπτιδίου από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Έτσι, θα είναι δυνατή η ανίχνευση και η απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών μέσω της ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ στρεπταβιδίνης-βιοτίνης.

Για τη δημιουργία της κατασκευής pcDNA3-BIO-C χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια που αναφέρονται και περιγράφονται στον Πίνακα 5:

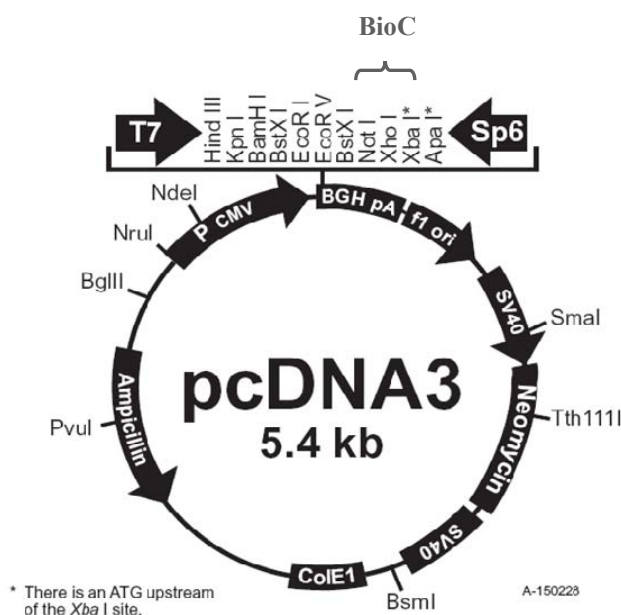
Πίνακας 5: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία *biotin acceptor domain*

<i>Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου</i>	<i>Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίου</i>	<i>Χαρακτηριστικά</i>
BIO-PEP-3	5'- GGC CGC TTG CCT CTT CCC TGA GAC AGA TCC TCG ACA G- 3'	Φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο NotI (πιο έντονη γραφή).
BIO-PEP-3C	5'-TTC TGG CTG TCG AGG ATC TGT CTC AGG GAA GAG GCA AGC-3'	Αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία του BIO-PEP-3.
BIO-PEP-4	5'-CCA GAA GAT GGA GTG GCG CTC CAA CGC AGG AGG CTC TTG AT-3'	Αλληλουχία που φέρει κωδικόνιο λήξης (πιο έντονη γραφή) για τον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.
BIO-PEP-4C	5'-CTA GAT CAA GAG CCT CCT GCG TTG GAG CGC CAC TCC ATC-3'	Αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία BIO-PEP-4. Φέρει θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο XbaI (πιο έντονη γραφή).

Το ολιγονουκλεοτίδιο 'BIO-PEP-3' σχεδιάστηκε να φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο NotI ενώ το ολιγονουκλεοτίδιο 'BIO-PEP-4C' σχεδιάστηκε να φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο XbaI. Το ολιγονουκλεοτίδιο 'BIO-PEP-4' φέρει το κωδικόνιο λήξης TGA στην αλληλουχία του για τον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Τα παραπάνω ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του δίκλωνου μορίου DNA που θα κωδικοποιεί για την αμινοξική αλληλουχία που θα λειτουργήσει ως *biotin-acceptor domain* στην κατασκευή που θέλαμε να δημιουργήσουμε. Όπως περιγράφεται στην ενότητα ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ, αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις σχηματισμού δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων

από τις οποίες προέκυψαν τα δίκλιωνα μόρια BIO-PEP-3-3C και BIO-PEP-4-4C. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction) για να κλωνοποιηθούν τα δίκλιωνα μόρια BIO-PEP-3-3C και BIO-PEP-4-4C στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3 κομμένο με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Η ένθεση των ολιγονουκλεοτιδίων στον πλασμιδιακό φορέα επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση της κατασκευής.

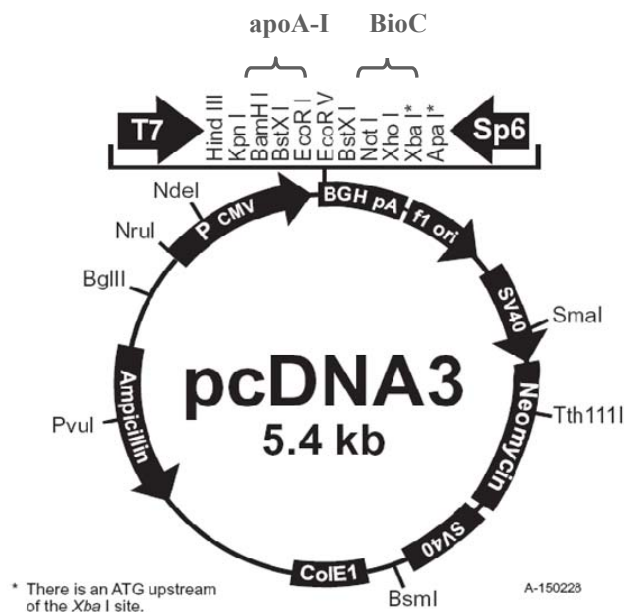


Εικ. 9: Χάρτης του πλασμιδίου αναφοράς pcDNA3 (Invitrogen). Μεταξύ των θέσεων περιορισμού NotI και XbaI κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία που κωδικοποιεί για το biotin acceptor domain BioC.

Δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA3-BIO-C-aroA-I

Στόχος μας ήταν η δημιουργία μίας μορφής της απολιποπρωτεΐνης A-I που να έχει την ικανότητα να βιοτινυλιωθεί *in vivo*. Πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του μεγαλύτερου μέρους της γενωμικής αλληλουχίας του γονιδίου της *aroA-I* (από το εξώνιο 1 μέχρι το σημείο πριν το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης στο εξώνιο 4) στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3-BIO-C που έχουμε κατασκευάσει όπως περιγράφεται παραπάνω. Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση την καταχωρημένη στην Genbank νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης *aroA-I*.

Ο εκκινητής “apoA-I BIO F” αναγνωρίζει μια περιοχή 33 βάσεις πριν την έναρξη της αλληλουχίας του 1^ο εξωνίου της γενωμικής αλληλουχίας της apoA-I και έχει σχεδιαστεί ώστε να φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BamHI. Ο εκκινητής “apoA-I BIO R” αναγνωρίζει την περιοχή ακριβώς πριν το κωδικόνιο λήξης της αλληλουχίας του γονιδίου της apoA-I και παράλληλα έχει σχεδιαστεί ώστε να φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Η αλληλουχία της apoA-I που τελικά κλωνοποιήθηκε ξεκινούσε από το εξώνιο 1 και έφτανε μέχρι πριν το κωδικόνιο λήξης στο εξώνιο 4. Με αυτόν τον τρόπο, όταν η αλληλουχία αυτή κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3-BIO-C, το biotin-acceptor domain θα είναι σε σύντηξη με το καρβοξυτελικό άκρο της apoA-I (έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα ΕΙΣΑΓΩΓΗ ότι το αμινοτελικό άκρο της apoA-I αποκόπτεται κατά την μετα-μεταφραστική τροποποίησή της).



Εικ. 10: Χάρτης της πλασμιδιακής κατασκευής pcDNA3-BioC. Μεταξύ των θέσεων περιορισμού BamHI και EcoRI κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία του γονιδίου της apoA-I του ανθρώπου μέχρι το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης.

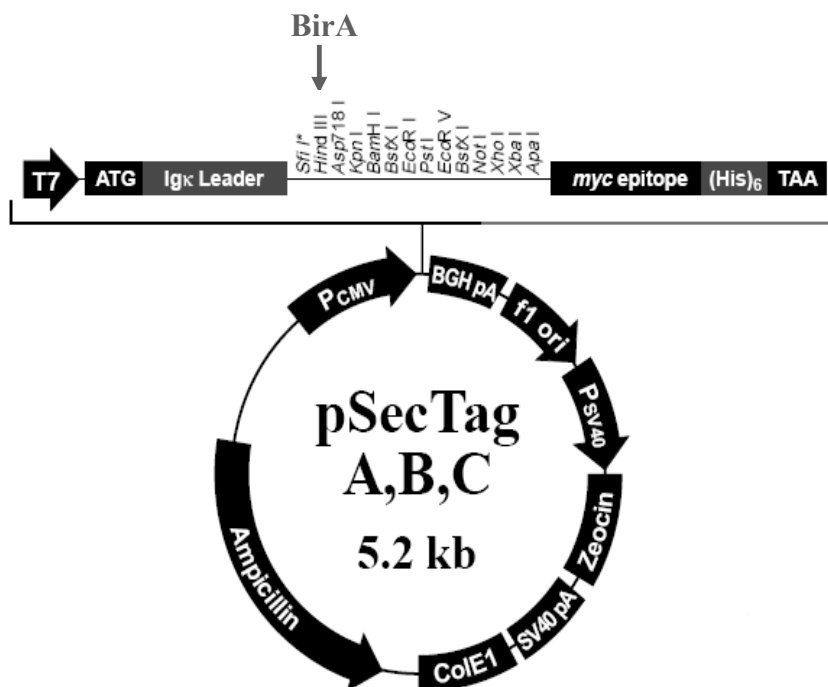
Δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής pSecTag-2B – BirA

Η αλληλεπίδραση avidin-biotin αποτελεί τη βάση μιας μεθοδολογίας για την βιοτινυλίωση πρωτεϊνών που η αμινοξική τους αλληλουχία βρίσκεται σε σύντηξη με ένα biotin-acceptor domain. Ωστόσο η εφαρμογή της μεθόδου αυτής περιορίζεται στη δυνατότητα βιοτινυλίωσης κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, καθώς η BirA κατά την πρωτεϊνοσύνθεσή της δεν περνά μέσα από το εκκριτικό μονοπάτι.

Η ένθεση της γενωμικής αλληλουχίας του ενζύμου της βακτηριακής λιγάσης βιοτίνης BirA σε ένα πλασμίδιο έκφρασης σχεδιασμένο να οδηγεί την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου στο εκκριτικό μονοπάτι μας δίνει τη δυνατότητα να επιτύχουμε τη βιοτινυλίωση εκκρινόμενων πρωτεϊνών όπως είναι οι απολιποπρωτεΐνες.

Ο πλασμιδιακός φορέας pSecTag-2B που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της κατασκευής αυτής, φέρει πριν την αλληλουχία του polylinker, μία αλληλουχία που κωδικοποιεί για το πεπτίδιο-οδηγό (leader peptide) της ανοσοσφαιρίνης Igκ (Εικ. 11), το οποίο είναι υπεύθυνο για την καθοδήγηση της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκειμένου να ακολουθήσει το εκκριτικό μονοπάτι. Το πεπτίδιο-οδηγός βρίσκεται σε σύντηξη με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, με την BirA στην προκειμένη περίπτωση, οδηγώντας την στο εκκριτικό μονοπάτι. Η εκκρινόμενη μορφή της BirA που προκύπτει έχει τη δυνατότητα να βιοτινυλίωσε πρωτεΐνες που περνούν μέσα από αυτό.

Η ήδη υπάρχουσα πλασμιδιακή κατασκευή pBS-2myc-BirA που φέρει την γενωμική αλληλουχία του γονιδίου της BirA, επώαστηκε με το περιοριστικό ένζυμο HindIII για την απομόνωση της αλληλουχίας του γονιδίου της BirA. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11 το γονίδιο της BirA μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pSecTag-2B στη θέση περιορισμού για το ένζυμο HindIII προκειμένου να δημιουργήσουμε μία εκκρινόμενη μορφή της BirA



Εικ. 11: Χάρτης του πλασμιδίου pSec-Tag-2B (Invitrogen). Φέρει την αλληλουχία για το πεπτιδιο-οδηγό της ανοσοσφαιρίνης Igκ (Igκ leader) δίπλα στο οποίο κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της πρωτεΐνης BirA.

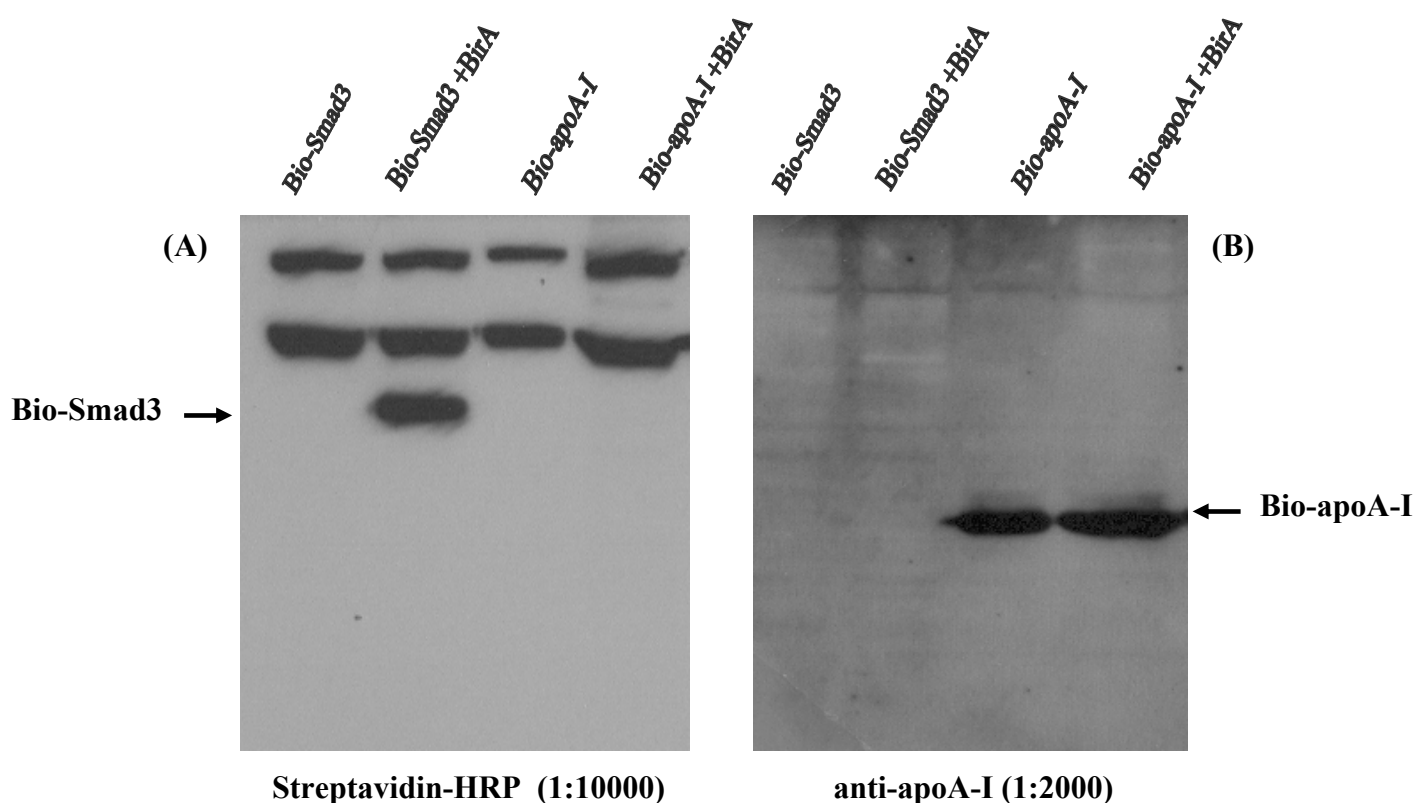
Δοκιμασία βιοτινυλίωσης της bio-aroA-I

Θέλουμε να ελέγξουμε αν θα είναι δυνατή η ανίχνευση της έκφρασης της *aroA-I* μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ στρεπταβιδίνης και βιοτίνης καθώς η *aroA-I* θα φέρει στο καρβοξυτελικό της άκρο αμινοξική ακολουθία που μπορεί να βιοτινυλωθεί.

Η δυνατότητα βιοτινυλίωσης της *aroA-I* μέσω της δράσης της εκκρινόμενης μορφής της BirA μελετήθηκε στην κυτταρική σειρά HEK 293 T η οποία δεν εκφράζει ενδογενώς την *aroA-I*. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω παροδικής συν-επιμόλυνσης κυττάρων με τα πλασμίδια έκφρασης pcDNA3-BIO-C-*aroA-I* (εκφράζει την *aroA-I* σε σύντηξη με το biotin-acceptor domain), pSecTag-2B – BirA (εκφράζει μια εκκρινόμενη μορφή της BirA) και pBS-2myc-BirA (εκφράζει την φυσιολογική κυτταροπλασματική μορφή της BirA).

Ως πείραμα ελέγχου πραγματοποιήθηκε παροδική συν-επιμόλυνση κυττάρων με τα πλασμίδια έκφρασης pcDNA3-BIO-C-*aroA-I*, pcDNA3-BIO-Smad3 και pBS-2myc-BirA. Ακολούθησε συλλογή του θρεπτικού μέσου των κυττάρων για τα δείγματα που είχε γίνει επιμόλυνση με το πλασμίδιο έκφρασης pcDNA3-BIO-C-*aroA-I*, καθώς η

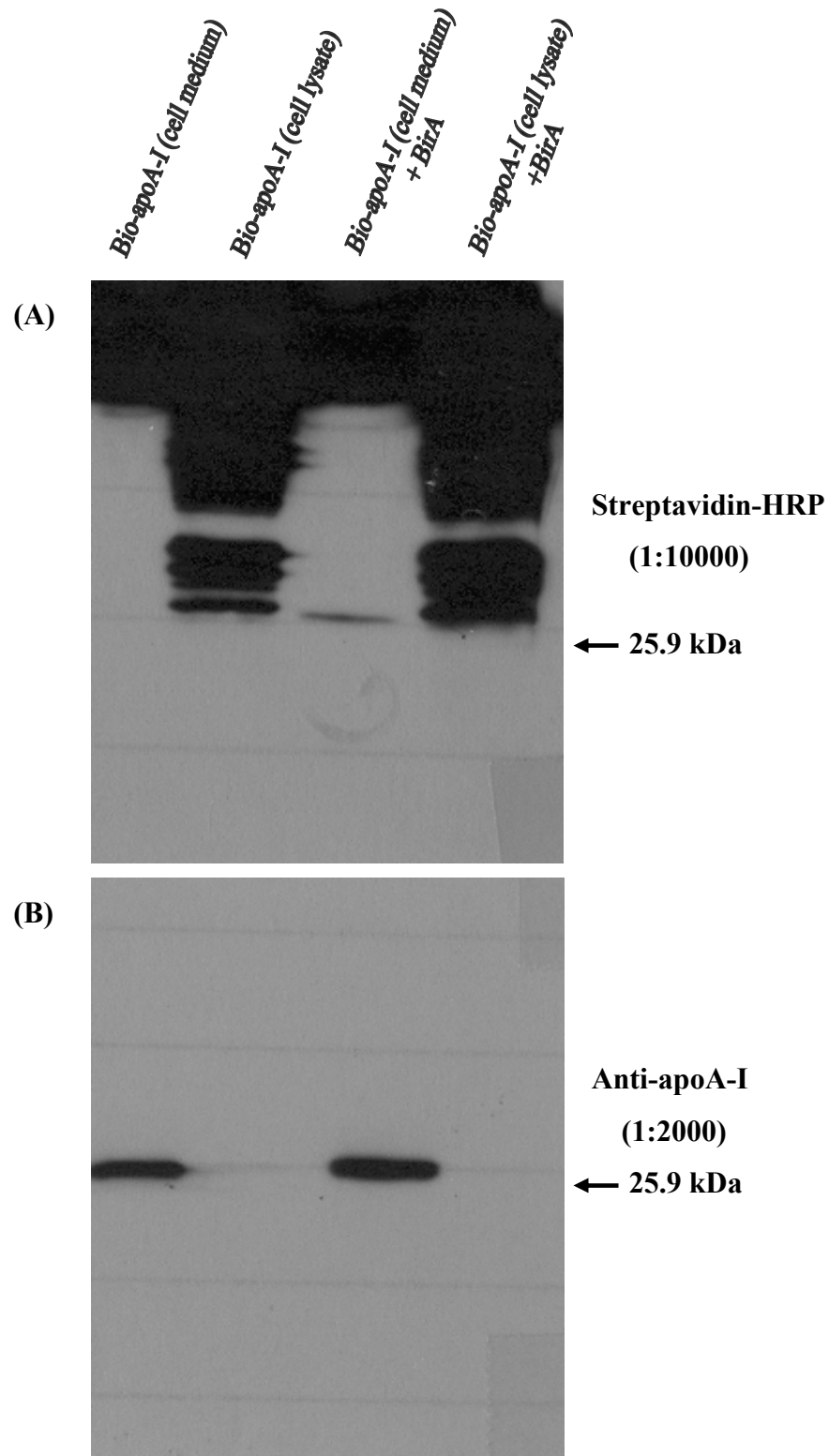
apoA-I είναι εκκρινόμενη πρωτεΐνη, και του κυτταρικού εκχυλίσματος για τα δείγματα ελέγχου (control) όπου είχε πραγματοποιηθεί επιμόλυνση με το πλασμίδιο έκφρασης pcDNA3-BIO-Smad3. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western των δειγμάτων του θρεπτικού μέσου που συλλέχθηκε και των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12A και 12B, η ανίχνευση της έκφρασης της apoA-I ήταν δυνατή με χρήση του αντισώματος anti-apoA-I αλλά όχι με χρήση Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase). Στα δείγματα ελέγχου φαίνεται ότι η πρωτεΐνη Smad3 ανιχνεύεται με το Streptavidin-HRP, επομένως είναι βιοτινυλιωμένη. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η apoA-I εκφράζεται φυσιολογικά, ωστόσο η πρωτεΐνη που εκκρίνεται δεν είναι βιοτινυλιωμένη.



Εικ. 12: Δοκιμασία βιοτινυλίωσης της apoA-I σε κύτταρα HEK 293T. (A) Κύτταρα HEK 293T διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια έκφρασης που αναφέρονται στο πάνω μέρος της εικόνας. Η ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης Smad3 (που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα θετικού ελέγχου) και της apoA-I έγινε με στύπωμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε Streptavidin-HRP. Το βέλος δείχνει την βιοτινυλιωμένη Smad3 πρωτεΐνη. Η apoA-I δεν ανιχνεύθηκε με αυτή τη δοκιμασία. (B) Όπως ακριβώς και στο (A) μόνο που η ανίχνευση της apoA-I που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο έγινε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει την apoA-I του ανθρώπου.

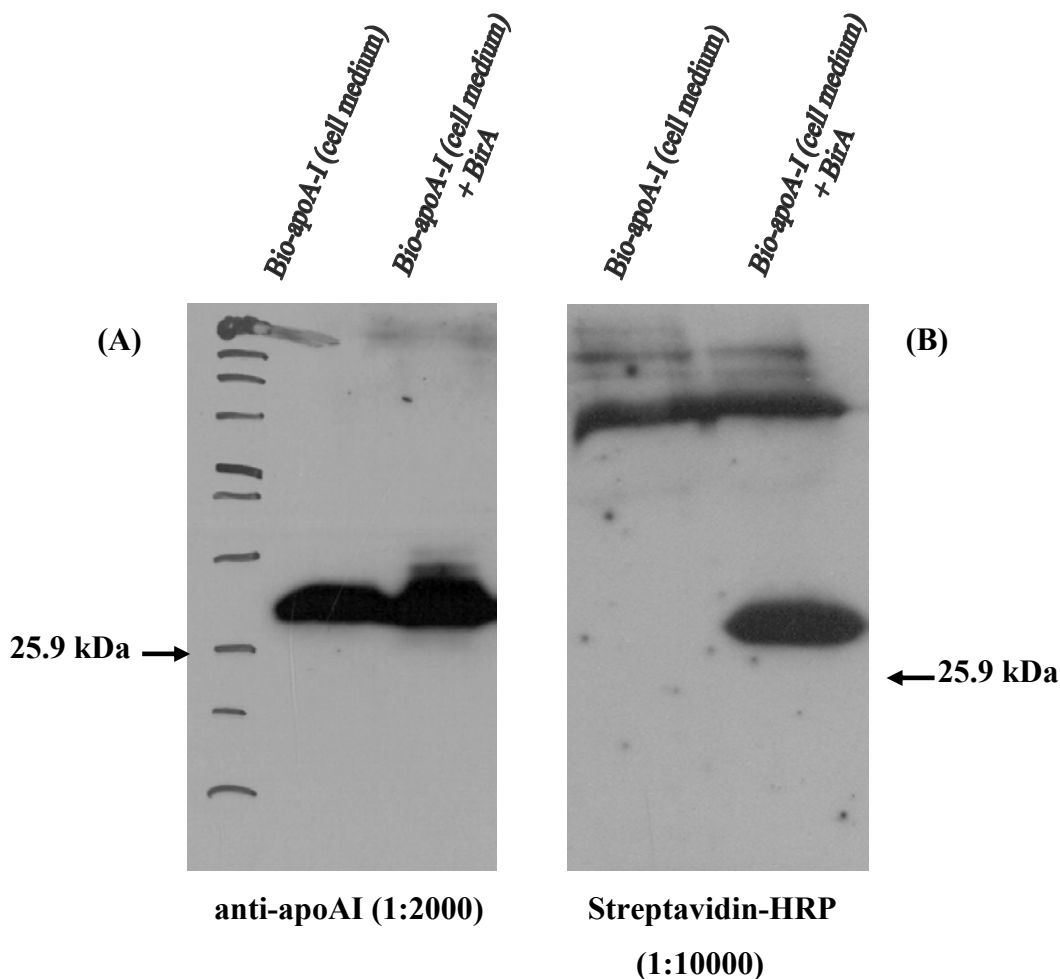
Η πρώτη προσπάθεια βιοτινυλίωσης της apoA-I με συν-επιμόλυνση κυττάρων HEK 293 T με το πλασμίδιο έκφρασης pSecTag-2B – BirA για την εκκρινόμενη μορφή της BirA δεν έδωσε το αναμενόμενο αποτέλεσμα, καθώς δεν μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε την βιοτινυλιωμένη apoA-I.

Ακολούθησε επανάληψη του πειράματος με τη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή το θρεπτικό μέσο των κυττάρων αλλά και το κυτταρικό εκχύλισμα που συλλέχθηκαν μετά την επιμόλυνση των κυττάρων επώαστηκαν με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η επώαση με τα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης είχε σαν στόχο την συγκέντρωση της τυχόν βιοτινυλιωμένης apoA-I σε μικρότερο όγκο για την ευκολότερη ανίχνευσή της. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 13A και 13B η έκφραση της apoA-I ανιχνεύεται (επώαση με αντίσωμα anti-apoA-I) στο θρεπτικό μέσο αλλά όχι στο κυτταρικό εκχύλισμα. Επίσης μία ποσότητα της apoA-I που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο εμφανίζεται βιοτινυλιωμένη (επώαση με αντίσωμα Streptavidin-HRP). Φαίνεται ότι ακόμα και με την έκφραση της εκκρινόμενης μορφής της BirA, τελικά ένα μικρό ποσοστό της συνολικά εκφραζόμενης, εκκρινόμενης apoA-I τελικά βιοτινυλιώνεται. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η έκφραση της apoA-I ανιχνεύεται στο δείγμα όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί συν-επιμόλυνση με το πλασμίδιο έκφρασης pSecTag-2B – BirA και το θρεπτικό μέσο επώαστηκε με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Είναι πιθανόν η apoA-I να προσδένεται μη ειδικά στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται με το αντίσωμα anti-apoA-I ακόμα και στην περίπτωση που δεν είναι βιοτινυλιωμένη.



Εικ. 13: Δοκιμασία βιοτινυλίωσης της apoA-I σε κύτταρα HEK 293T. (A) Κύτταρα HEK 293T διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια έκφρασης που αναφέρονται στο πάνω μέρος της εικόνας. Η ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης apoA-I έγινε με στύπωμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε Streptavidin-HRP. Η apoA-I ανιχνεύθηκε στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων αλλά όχι στο κυτταρικό εκχύλισμα. (B) Όπως και στο (A) μόνο που η ανίχνευση της apoA-I που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο έγινε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει την apoA-I του ανθρώπου. Συγκρίνοντας τις δύο εικόνες παρατηρούμε ότι ένα μικρό ποσοστό της συνολικά εκφραζόμενης Bio-apoA-I βιοτινυλιώνεται με την συν-έκφραση της εκκρινόμενης μορφής της BirA.

Ακολούθησε επανάληψη του παραπάνω πειράματος με τη διαφορά ότι κατά την παροδική συν-επιμόλυνση κυττάρων προστέθηκε μεγαλύτερη ποσότητα του πλασμιδίου έκφρασης pSecTag-2B – BirA ενώ η ποσότητα του πλασμιδίου έκφρασης pcDNA3-BIO-C-aroA-I διατηρήθηκε σταθερή. Θέλουμε να ελέγξουμε αν η έκφραση αυξημένης ποσότητας εκκρινόμενης BirA θα έχει σαν αποτέλεσμα να βιοτινυλιωθεί μεγαλύτερο ποσοστό της αροΑ-I που θα εκφραστεί και θα εκκριθεί από τα κύτταρα. Το θρεπτικό μέσο των κυττάρων αναλύθηκε και πάλι με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση της έκφρασης της βιοτινυλιωμένης αροΑ-I. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14Α και Β, το ποσοστό της αροΑ-I που εμφανίζεται βιοτινυλιωμένο έχει αυξηθεί με την αύξηση της ποσότητας της εκκρινόμενης BirA με την οποία επιμολύνθηκαν τα κύτταρα.



Εικ. 14: Δοκιμασία βιοτινυλίωσης της αροΑ-I σε κύτταρα HEK 293T. (Α) Κύτταρα HEK 293T διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια έκφρασης που αναφέρονται στο πάνω μέρος της εικόνας. Η ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης αροΑ-I έγινε με στύπωμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε Streptavidin-HRP. (Β) Όπως και στο (Α) μόνο που η ανίχνευση της αροΑ-I που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο έγινε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει την αροΑ-I του ανθρώπου. Συγκρίνοντας τις δύο εικόνες παρατηρούμε ότι το ποσοστό της bio-aroAI που τελικά βιοτινυλιώθηκε είναι ιδιαίτερα αυξημένο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δημιουργία ανασυνδυσασμένων αδενοϊών για τις apoA-IV και apoA-II με σκοπό την *in vivo* μελέτη των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών

Η στρατηγική της μεταφοράς γονιδίων με το σύστημα των ανασυνδυσασμένων αδενοϊών σε ποντικούς έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα μια επιτυχημένη προσέγγιση για την *in vivo* μελέτη δράσης των απολιποπρωτεϊνών. Μερικά από τα σημαντικά πλεονεκτήματα του συστήματος των ανασυνδυσασμένων αδενοϊών είναι η ικανότητα ενός αδενοϊού να μολύνει πολλούς και διαφορετικούς τύπους κυττάρων ενώ παράλληλα επιτυγχάνονται ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν.

Βασικός στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η δημιουργία ανασυνδυσασμένων αδενοϊών που θα εκφράζουν τις apoA-IV και apoA-II του ανθρώπου και οι οποίοι μελλοντικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την *in vivo* μελέτη του ρόλου των συγκεκριμένων απολιπρωτεϊνών στην αθηρωμάτωση καθώς ο τρόπος δράσης τους δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Το σύστημα των ανασυνδυσασμένων αδενοϊών έχει ήδη χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την μελέτη της δράσης της απολιποπρωτεΐνης A-I αλλά και σημαντικών μεταλλαγμάτων της *in vivo*.

Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα δείχνουν ότι η apoA-IV συμμετέχει στο μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης έχοντας αρκετά κοινά χαρακτηριστικά όσον αφορά τον τρόπο δράσης με την καλύτερα μελετημένη apoA-I και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από την εμφάνιση αθηρωμάτωσης.

Κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, η γενωμική αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης apoA-IV κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και στη συνέχεια κατασκευάστηκε ο ανασυνδυσασμένος αδενοϊός που εκφράζει την apoA-IV. Η έκφραση της πλασμιδιακής κατασκευής pAd-Track-CMV-apoA-IV η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του αντίστοιχου ανασυνδυσασμένου αδενοϊού Ad-GFP-apoA-IVwt ελέγχθηκε με PCR αντίστροφης μεταγραφής και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 4.

Μέσα από τις *in vivo* και *in vitro* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα φαίνεται ότι η apoA-II αν και αποτελεί βασικό δομικό συστατικό της HDL δεν συμβάλλει στην προστασία του οργανισμού ενάντια στην αθηρωμάτωση όπως οι απολιποπρωτεΐνες A-I και A-IV.

Αντίστοιχα, η γενωμική αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης apoA-II κλωνοποιήθηκε στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και στη συνέχεια κατασκευάστηκε ο ανασυνδυασμένος αδενοϊός που εκφράζει την apoA-II. Η έκφραση της πλασμιδιακής κατασκευής pAd-Track-CMV-apoA-II η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του αντίστοιχου ανασυνδυασμένου αδενοϊού ελέγχθηκε επίσης με PCR αντίστροφης μεταγραφής και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 6.

Κατά τη διάρκεια παραγωγής των παραπάνω ανασυνδυασμένων αδενοϊών, η ανίχνευση της έκφρασής τους γινόταν με παρακολούθηση της έκφρασης GFP τόσο στα κύτταρα που αρχικά διαμολύνθηκαν με τους ανασυνδυασμένους αδενοϊικούς φορείς για την παραγωγή των αδενοϊών όσο και στα κύτταρα που στη συνέχεια μολύνθηκαν με κυτταρικό λύμα ή με κατάλληλη αραίωση αδενοϊού. Στην Εικόνα 8 εμφανίζονται κύτταρα της σειράς 911 που έχουν διαμολυνθεί με ανασυνδυασμένο αδενοϊικό φορέα στο πρώτο στάδιο παραγωγής ανασυνδυασμένων αδενοϊών και φαίνεται καθαρά η έκφραση της GFP. Σε αυτή την περίπτωση, η έκφραση της GFP μας δείχνει τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί και εκφράζουν τον αδενοϊό.

Μετά τη διαδικασία παραγωγής των ανασυνδυασμένων αδενοϊών (περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ) ακολουθεί η διαδικασία τιτλοδότησης των αδενοϊών προκειμένου να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των ιικών σωματιδίων για κάθε αδενοϊική κατασκευή. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετική μέθοδος για την τιτλοδότηση κάθε αδενοϊού. Για την τιτλοδότηση του ιού Ad-apoA-IV χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών (plaque assay), ενώ για την τιτλοδότηση του ιού Ad-apoA-II χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τιτλοδότησης μέσω της καταμέτρησης μεμονωμένων κυττάρων που εκφράζουν GFP μετά από μόλυνση με τον αδενοϊό (rapid titration method).

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της τιτλοδότησης των δύο ιών (Πίνακας 4) η συγκέντρωση των αδενοϊικών σωματιδίων ανά ml είναι ικανοποιητική σύμφωνα με την σχετική βιβλιογραφία (He et al, 1998). Οι συγκεκριμένοι αδενοϊοί θα χρησιμοποιηθούν όπως ήδη αναφέραμε για την *in vivo* μελέτη της δράσης των απολιποπρωτεϊνών A-IV και A-II.

Βιοτινυλίωση της εκκρινόμενης apoA-I

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει σε προηγούμενη ενότητα, η ισχυρή αλληλεπίδραση στρεπταβιδίνης-βιοτίνης χρησιμοποιείται σε αρκετές εφαρμογές στο πεδίο της μοριακής βιολογίας όπως η απομόνωση και ο καθαρισμός πρωτεϊνών, η ανοσοϊστοχημεία αλλά και η γονιδιακή θεραπεία. Ωστόσο, αρχικά η συγκεκριμένη τεχνολογία ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί μόνο σε περιπτώσεις κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών. Η λιγάση της βιοτίνης, το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της βιοτινυλίωσης, είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη η οποία κατά τη σύνθεσή της δεν περνάει μέσα από το εκκριτικό μονοπάτι όπως οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Για την επίτευξη της βιοτινυλίωσης μιας εκκρινόμενης πρωτεΐνης, της apoA-I στην προκειμένη περίπτωση, ακολουθήθηκε μία διαφορετική στρατηγική. Η γενωμική αλληλουχία της BirA (η λιγάση της βιοτίνης που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *E. coli*) κλωνοποιήθηκε μέσα σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ο οποίος πριν την αλληλουχία της περιοχής κλωνοποίησης (polylinker) φέρει συγκεκριμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί για το πεπτίδιο-οδηγό της ανοσοσφαιρίνης Igκ το οποίο είναι υπεύθυνο για την καθοδήγηση της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης μέσα από το εκκριτικό μονοπάτι. Έτσι δημιουργήθηκε μία εκκρινόμενη μορφή της BirA που θα μπορούσε να βιοτινυλιώσει μία μορφή της apoA-I που φέρει στο καρβοξυτελικό της άκρο ένα biotin-acceptor domain.

Η παραπάνω μέθοδος δοκιμάστηκε για πρώτη φορά από τους Parrott et al και είχε ως στόχο τη δημιουργία μιας εκκρινόμενης μορφής της BirA που να μπορεί να βιοτινυλιώσει την εκκρινόμενη πρωτεΐνη α1-antitrypsin του ανθρώπου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα της σειράς CHO (Chinese hamster ovary). Εκείνο που παρατηρήθηκε είναι ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορούσε να βιοτινυλιωθεί μόνο με την συν-έκφραση της εκκρινόμενης μορφής της BirA (Parrott et al, 2001). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμφωνούν με τα αποτελέσματα των δοκιμών βιοτινυλίωσης της apoA-I που παρουσιάζονται στην προηγούμενη ενότητα με τη διαφορά ότι στην περίπτωση της apoA-I η βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη ανιχνεύεται μόσο στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων και όχι στο κυτταρικό εκχύλισμα. Αντίθετα στην περίπτωση της πρωτεΐνης α1-antitrypsin, η βιοτινυλιωμένη μορφή της ανιχνεύεται και στα θρεπτικό μέσο των κυττάρων και στο κυτταρικό εκχύλισμα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ελέγχου που παρουσιάζονται στην Εικόνα 12A και B δείχνουν ότι σε αντίθεση με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Smad3 (χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη-control) η μη εκκρινόμενη μορφή της BirA δεν μπορεί να βιοτινυλιώσει την bio-aroA-I η οποία όπως φαίνεται εκφράζεται φυσιολογικά. Αντίθετα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13A, η εκκρινόμενη μορφή της BirA μπορεί να βιοτινυλιώσει ένα ποσοστό της εκκρινόμενης bio-aroA-I το οποίο όμως είναι μικρό σε σχέση με την συνολικά παραγόμενη bio-aroA-I όπως φαίνεται στην Εικόνα 13B.

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε με την εξής τροποποίηση: τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν με μεγαλύτερη ποσότητα του πλασμιδίου έκφρασης pSecTag-2B-BirA (20μg αντί για 15μg) ενώ η ποσότητα του πλασμιδίου pcDNA3-Bio-C-aroA-I με την οποία συνεπιμολύνθηκαν τα κύτταρα διατηρήθηκε σταθερή. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14A και B, το ποσοστό της εκκρινόμενης bio-aroA-I που τελικά βιοτινυλιώθηκε είναι αυξημένο σε σχέση με την συνολικά παραγόμενη bio-aroA-I.

Από τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το ποσοστό της παραγόμενης bio-aroA-I που τελικά βιοτινυλιώνεται εξαρτάται σε ένα βαθμό από την ποσότητα της εκκρινόμενης BirA που παράγεται.

Από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της, γνωρίζουμε ότι στην ελεύθερη λιπιδίων κατάσταση η aroA-I διατηρεί μια σχετικά κλειστή δομή. Είναι πιθανό, η διαμόρφωση της aroA-I στο χώρο να μην επιτρέπει εύκολα την πρόσβαση στο biotin acceptor domain το οποίο βρίσκεται σε σύντηξη με το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Έτσι τελικά, η εκκρινόμενη μορφή της BirA καταφέρνει να βιοτινυλιώσει ένα μικρό ποσοστό της εκφραζόμενης bio-aroA-I.

Η δημιουργία μίας μορφής της aroA-I που θα μπορεί να βιοτινυλιωθεί (bio-aroA-I), μπορεί να δώσει μελλοντικά τη δυνατότητα απόμικσης σωματιδίων HDL από το πλάσμα του αίματος που θα περιέχουν βιοτινυλιωμένη aroA-I μέσω της αλληλεπίδρασης στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά είναι δυνατόν να κατασκευαστούν αδενοϊοί που θα εκφράζουν την εκκρινόμενη μορφή της BirA και την μορφή της aroA-I που μπορεί να βιοτινυλιωθεί. Η συνδυασμένη μόλυνση ποντικών με τους παραπάνω αδενοϊούς μπορεί να οδηγήσει στην έκκριση βιοτινυλιωμένης aroA-I στο πλάσμα του αίματος. Η απομόνωση των HDL σωματιδίων για την πραγματοποίηση περαιτέρω αναλύσεων στη συνέχεια από το πλάσμα του αίματος των ζώων θα είναι δυνατή μέσω της αλληλεπίδρασης βιοτίνης-

στρεπταβιδίνης καθώς στο πλάσμα φυσιολογικά δεν υπάρχουν βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H. and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518-520.

Ajees, A.A., Anathamaraiah, G.M., Mishra, V.K., Mahmood Hussain, M. and Krishna Murthy, H.M. (2006) Crystal structure of human apolipoprotein A-I: Insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2126-2131.

Borhani, D.W., Rogers, D.P., Engler, J.A. and Brouillette, C.G. (1997) Crystal structure of truncated human apoA-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12291-12296.

Brewer, H.B., Lux, S.E., Ronan, R., Meng, M. and Bishop, C. (1986) Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II and A-IV. *Methods Enzymol.* **128**, 223-246.

Chroni, A., Liu, T., Gorshkova, I., Kan, H.Y., Uehara, Y., Eckardstein, A., Zannis, V. (2003) The central helices of apoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. *J. Biol. Chem.* **278**, 6719-6730.

Cohen, R.D., Castellani, L.W., Qiao, J.H., Van Lenten, B.J., Lusis, A.J. and Reue, K. (1997) Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J. Clin. Invest.* **99**, 1906-1916.

De Beer, M.C., Durbin, D.M., Cai, L., Mirocha, N., Jonas, A., Webb, N.R., De Beer, F.C. and Van Der Westhuyzen, D.R. (2001) Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high density lipoprotein by scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.* **276**, 15832-15839.

Duverger, N., Treppe, G., Caillaud, J.M., Emmanuel, F., Castro, G., Fruchart, J.C., Steinmetz, A., Deneffe, P. (1996) Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science* **273**, 966-968.

Elshourbagy, N.A., Walker, D.W., Paik, Y.K., Boguski, M.S., Freeman, M., Gordon, J.I. and Taylor, J.M. (1987) Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene. *J. Biol. Chem.* **262**, 7973-7981.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Moroni, C., Savino, S., Liuzzi, A., Balzola, F., and Bicchiera V. (2005) Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J. Clin. Endoc. Metab.* **90**, 1728-1733.

Fournier, N., Atger, V., Paul, J.L., Sturm, M., Duverger, N., Rothblat, G.H., and Moatti, N. (2000) Human apoA-IV overexpression in transgenic mice induces cAMP-stimulated cholesterol efflux from J774 macrophages to whole serum. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1283-1292.

He, T.C., Shibin, Z., Da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Volgestein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2509-2514.

Hessler, J.R., Robertson, A.L. and Ghisolm, G.M. (1979) LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis* **32**, 213-229.

Karathanasis, S.K. (1985) Apolipoprotein multigene family: Tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII and AIV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 6374-6378.

Lackner, K.J., Law, S.W., Brewer, H.B., Sakaguchi, A.Y. and Naylor, S.L. (1984) The human apolipoprotein A-II gene is located on chromosome 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 877-883.

Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M.F., Chimini, G., Kaminski, W.E. and Schmitz, G. (1999) Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 29-33.

Li, A.C. and Glass, C.K. (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature* **8**, 1235-1242.

Loscalzo, J. (2004) Molecular mechanisms of atherosclerosis.

Navab, M., Berliner, J.A., Subbanagounder, G., Hamma, S., Lusis, A.J., Castellani, L.W., Reddy, S., Shih, D., Shi, W., Watson, A.D., Van Lenten, B.J., Vora, D. and Fogelman, A.M. (2001) HDL inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 481-488.

Oram, J.F., and Yokoyama, S. (1996) Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.* **37**, 2473-2491.

Ostos, M.A., Conconi, M., Vergnes, L., Baroukh, N., Ribalta, J., Girona, J., Caillaud, J.M., Ochoa, A., and Zakin, M.M. (2001) Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein AI-V in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1023-1028.

Parrott, M.B. and Barry, M.A. (2001) Metabolic biotinylation of secreted and cell surface proteins from mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 993-1000.

Pearson, K., Saito, H., Woods, S.C., Lund-Katz, S., Tso, P., Philips, M.C., and Davidson, W.S. (2004) Structure of human apolipoprotein A-IV: A distinct domain architecture among exchangeable apolipoproteins with potential functional implications. *Biochemistry* **43**, 10719-10729.

Polyak, S.W. and Chapman-Smith, A. (2004) Biotin. *Encycl. Biol. Chem.* **1**, 174-178.

Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H.B. (2001) Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 818-823.

Schultz, J.R., Verstuyft, J.G., Gong, E.L., Nichols, A.V. and Rubin, E.M. (1993) Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature* **365**, 762-764.

Segrest, J.P., Jones, M.K., De Loof, H., Brouillette, C.G., Venkatachalapathi, Y.V., and Anantharamaiah, G.M. (1992) The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* **33**, 141-166.

Shangzhe, X., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V.I. and Krieger, M. (1997) Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J. Lipid Res.* **38**, 1289-1298.

Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N. (1999) Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2214-2225.

Soutar, A.K., Garner, C.W., Baker, H.N., Sparrow, J.T., Jackson, R.L., Gotto, A.M. and Smith, L.C. (1975) Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* **14**, 3057-3064.

Spady, D.K. (1999) Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation* **100**, 576-578.

Steinmetz, A., and Utermann, G. (1985) Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. *J. Biol. Chem.* **260**, 2258-2264.

Swaney, J.B., Reese, H. and Eder, H.A. (1974) Polypeptide composition of rat high-density lipoprotein: Characterization by SDS-gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 513-519.

Tailleux, A., Duriez, P., Fruchart, J.C. and Clavey, V. (2002) Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **164**, 1-13.

Tubb, M.R., Gangani, R.A., Silva, D., Fang, J., Tso, P., and Davidson W.S. (2008) A three-dimensional homology model of lipid-free apolipoprotein A-IV using cross-linking and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **25**, 17314-17323.

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matura, F. and Tall, A.R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9774-9779.

Warden, C.H., Hedrick, C.C., Qiao, J.H., Castellani, L.W. and Lusis, A.J. (1993) Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science* **261**, 469-472.

Weinstock, P.H., Bisgaier, C.L., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Sehayek, E., Wu, L., Sheffele, P., Merkel, M., Essenburg, A.D. and Breslow, J.L. (1997) Decreased HDL cholesterol levels but normal lipid absorption, growth and feeding behaviour in apolipoprotein A-IV knockout mice. *J. Lipid Res.* **38**, 1782-1794.

Williamson, R., Lee, D., Hagaman, J. and Maeda, N., (1992) Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7134-7138.

Zannis, V.I., Chroni, A. and Krieger, M. (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J. Mol. Med.* **84**, 276-294.