

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ & ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ–ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ**  
**ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ**  
**ΑΠΟΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-Ι ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΣ**

**ΙΟΥΛΙΟΣ 2007**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ & ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ–ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ**  
**ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ**  
**ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-Ι ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΣ**  
του Κωνσταντίνου και της Χριστίνας

**ΙΟΥΛΙΟΣ 2007**

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Δρ. Ζαννής Ι. Βασίλειος** (επιβλέπων )

Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Δρ. Καρδάσης Δημήτριος** (μέλος τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Δρ. Ταλιανίδης Ιάnnης** (μέλος τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης)

Ερευνητής Α' και Διευθυντής, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Ε.ΚΕ.Β.Ε.  
«Αλ. Φλέμινγκ»

**Δρ. Στουρνάρας Χρήστος**

Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Δρ. Μπούμπας Δημήτριος**

Καθηγητής και Διευθυντής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Δρ. Γραβάνης Αχιλλέας**

Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Δρ. Ηλιόπουλος Αριστείδης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακή και Κυτταρικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

*Στην γονείς μου  
Κωνσταντίνο και Χριστίνα  
και την αδελφή μου Αλεξάνδρα,  
για την συνεχή υποστήριξη, κατανόηση και Αγάπη τους.  
Η χαρά και η υπερηφάνεια που νιώθουν  
μου δίνει δύναμη να συνεχίζω, και δίνει νόημα σε αυτά που κάνω  
και  
στην μνήμη του παπού μου Κωνσταντίνου Τσίκλη  
γιατί αποτέλεσε παράδειγμα ζωής και  
με έμαθε ότι «η σκληρή δουλεία δεν είναι ποτέ αχάριστη»!*

## Ευχαριστίες

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της Διδακτορικής μου διατριβής είναι υποχρέωση και εσωτερική μου ανάγκη να ευχαριστίσω όσους βοήθησαν στο να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω το σημαντικό αυτό κομμάτι των σπουδών μου.

Είμαι ευγνώμων στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ.Βασίλη Ζαννή, γιατί με επέλεξε ως μεταπτυχιακό φοιτητή του, μου επέτρεψε να εργαστώ στο εργαστήριο του τομέα Μοριακής Γενετικής του Whitaker Cardiovascular Institute του Πανεπιστημίου της Βοστώνης και με καθοδήγησε στην τελική διαμόρφωση αυτής της διατριβής. Με την επιλογή του αυτή μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ και να συμμετάσχω ενεργά στο ακαδημαϊκό και επιστημονικό περιβάλλον του Πανεπιστημίου της Βοστώνης, να παρουσιάσω την εργασία μου σε επιστημονικά συνέδρια, όπως το παγκοσμίου φήμης συνέδριο του Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (ATVB 2007) και να γνωρίσω σημαντικούς επιστήμονες στο χώρο της Βιοϊατρικής έρευνας. Μαζί, ευχαριστώ θερμά την Δρ.Ελένη Ζαννή για την φιλοξενία της τους πρώτους μήνες εγκατάστασής μου στην Βοστώνη και τις υπέροχες συζητήσεις που είχαμε.

Σημαντική συμβολή στα παραπάνω είχε ο Δρ.Δημήτρης Καρδάσης που πρώτος αυτός με επέλεξε να εργαστώ στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης αλλά και γιατί η συμβολή του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της Διδακτορικής μου Διατριβής υπήρξε καταλυτική, εκεί που χρειαζόταν. Μαζί του και με την βοήθεια της αξιόλογης βιολόγου και φίλης Παρασκευής Παπακώστα απέκτησα την τεχνική γνώση και τον επιστημονικό τρόπο σκέψης που αποδείχτηκαν πολύτιμα εφόδια κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Ο Δρ.Δημήτρης Καρδάσης, επίσης, μου δίδαξε να μην ψάχνω το αναμενόμενο αλλά να ερμηνεύω τα αποτελέσματα και να ψάχνω την αλήθεια. Για όλα αυτά, του εκφράζω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου.

Στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της διδακτορικής μου διατριβής είχα την τιμή να συμμετάσχει και ο Δρ.Ταλιανίδης Ιάnnης, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τις σημαντικές παρεμβάσεις του στην διαμόρφωση της μελέτης αυτής, και για την υποστήριξή του κατά την ολοκλήρωση της διατριβής.

Στην προσπάθεια αυτή σημαντική και αναγκαία είναι η συνεργασία με τα μέλη του εργαστηρίου. Ήταν χαρά και τιμή μου να συνεχίσω την έρευνα της Δρ.Αγγελικής Χρόνη που η βοήθειά της τόσο στο σχεδιασμό των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή των δημοσιεύσεων και της διατριβής ήταν ανεκτίμητη. Ευχαριστώ τους Δρ.Κυριάκο Κυπραίο και Dr.Horng Yuan Kan που μου έμαθαν την τεχνική των αδενοϊών, τον Δρ.Ιορδάνη Καραγιαννίδη για την φιλία του και την απλόχερη βοήθειά του στο εργαστήριο, τους φοιτητές Κωνσταντίνο Δροσάτο, Alex Vezzerides, Δρ.Σωτήρη Μπανάκο, Δρ.Κατερίνα Τζωρτζοπούλου και την γραμματέα Anne Plunkett για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, την Κωστιάννα Σερέτη για τις συζητήσεις μας και την φιλία της, καθώς και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Ανδρέα Κατεϊφίδη, συνεχιστή των ερευνών πάνω στην αποΑ-Ι. Ευχαριστώ ακόμα τους φίλους από το εργαστήριο στην Κρήτη, Δρ.Βίκυ Προκόβα, Δρ.Λίνα Βαρδούλη, Βαρβάρα Νικολαΐδου-Νεοκοσμίδου και Έφη Θυμακού.

Ανεκτίμητη ήταν η συμβολή που είχε η επαγγελματική οργανωτικότητα της τεχνικού Gayle Forbes που αποτελεί θεμέλιο λίθο του εργαστηρίου στην Βοστώνη. Ευχαριστώ, επίσης, θερμά την Dr.Adela Shkodrani που βοήθησε με τα πειραματόζωα και τις ενέσεις των αδενοϊών, αλλά και γιατί μαζί με τον Dr.Arvi Duka με στήριξαν με την φιλία τους σε όλη αυτή την προσπάθεια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω και στους φίλους που απέκτησα στις Η.Π.Α. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Γεωργία Νταλαγιώργου που μοιραστήκαμε τις δυσκολίες της καθημερινότητας στα χρόνια αυτής της δοκιμασίας και γιατί βοήθησε απίστευτα με την προσαρμογή μου στην Βοστώνη και την ψυχολογική μου ισορροπία. Επίσης, τον συγκάτοικό μου Fred Harbinski που μου στάθηκε σαν αδελφός, με κατανόηση και υπομονή, κατά την συγγραφή της διατριβής μου, όταν το σπίτι μετατράπηκε σε χώρο ολονύκτιας συγγραφής, και τους Νικόλαο Κουρούπη, Πέτρο Σκαλίδη και Christopher Anyfantis για την ψυχολογική ανάταση που μου πρόσφεραν, όποτε την χρειάστηκα.

Ευχαριστώ και τους φίλους μου στην Ελλάδα, Χρήστο Κερασίδη, Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο, Δημήτρη Θεοδωρακόπουλο, Ανδρέα Καράμπελα, Κώστα Καρτεζίνη και Μαργαρίτα Πρασά, Ξένια Καραγκούνη και Σταυριανή Καλαγκιά που παρόλη την μεγάλη απόσταση με κράτησαν κοντά στην Ελλάδα και τον εαυτό μου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην μεγάλη μου οικογένεια Τσίκλη, Κούκου, Θωμόπουλου, Αντζουλάτου και Ηλιόκαυτου που είναι πάντα δίπλα μου!

*Whatever you can do or dream you can, **BEGIN IT.***

*Boldness has genius, power and magic in it.*

*(Ό,τι μπορείς ή ονειρεύεσαι πως μπορείς να κάνεις, **ΞΕΚΙΝΑ ΤΟ.***

*Η Τόλμη έχει εοφρία, δύναμη και μαγία μέσα της.)*

*[Goethe]*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I) είναι η κύρια πρωτεΐνη των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) και παίζει σημαντικό ρόλο στην βιογένεση, τη δομή, την λειτουργία και την συγκέντρωση της HDL στο πλάσμα. Επιδημιολογικές μελέτες και κλινικές δοκιμές φανερώνουν ότι τα επίπεδα της HDL είναι αντιστρόφως ανάλογα του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου στον άνθρωπο.

Για την εξήγηση της μοριακής αιτιολογίας των χαμηλών επιπέδων HDL στον ανθρώπινο πληθυσμό που έχουν γενετική προέλευση, καθώς και για να μελετηθούν οι επιδράσεις δομικών αλλαγών της αποA-I στην βιογένεση της HDL, δημιουργήθηκαν ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές, αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, αποA-I(Leu178Pro) και αποA-I(Arg149Ala) και μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους, *in vitro* και *in vivo*.

Όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I εκκρίνονταν κανονικά και σε παρόμοια επίπεδα σε κυτταρικές καλλιέργειες. Η ικανότητα των μεταλλαγμένων μορφών αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, και αποA-I(Arg149Ala) να επάγουν ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης από καλλιέργειες μακροφάγων ήταν φυσιολογική ενώ εμφάνισαν δραματικά μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης της ακυλτρανσφεράσης λεκιθίνης : χοληστερόλης (LCAT), στο 0.41%, 2.07%, 28.4%, 2.7% και 5.2% της ικανότητας που εμφανίζει η αγριού τύπου (WT) αποA-I, σε *in vitro* πειράματα.

Για την κατανόηση της φυσιολογικής σημασίας των ιδιοτήτων των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, χρησιμοποιήθηκε μεταφορά γονιδίων μέσω αδενοϊών σε επίμυες με έλλειψη αποA-I (αποA-I<sup>-/-</sup>), η οποία οδήγησε σε διακριτούς φαινότυπους στα εν λόγω πειραματόζωα. Επίμυες που μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> παρουσίασαν τον βαρύτερο φαινότυπο και εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης και αποA-I πρωτεΐνης στο πλάσμα, 85% και 91%, αντίστοιχα, για την αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, και 89% και 87%, αντίστοιχα, για την αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, σε σχέση με επίμυες που εκφράζουν την WT αποA-I. Επίμυες που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, και αποA-



I(Arg149Ala) εμφανίζουν μείωση στην χοληστερόλη του πλάσματος κατά 78%, 59% και 61% και στην αποΑ-I κατά 68%, 64% και 55%, αντίστοιχα, σε σχέση με επίμυες που εκφράζουν την WT αποΑ-I.

Ο λόγος εστέρων χοληστερόλης προς ολική χοληστερόλη (CE/TC) στο πλάσμα των επίμυων που εκφράζουν οποιαδήποτε από τις πέντε μεταλλαγμένες μορφές ήταν σημαντικά μειωμένος και η κατανομή της αποΑ-I ήταν μετατοπισμένη προς μεγαλύτερης πυκνότητας HDL (HDL3). Παρόμοιες μελέτες για την μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Leu178Pro) έδειξαν ότι η έκφρασή της σε αποΑ-I<sup>-/-</sup> επίμυες οδηγεί σε φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν που παρατηρείται από την έκφραση της WT αποΑ-I.

Οι μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> δημιούργησαν preβ- και α4-HDL σωματίδια, και οδήγησαν στο σχηματισμό λίγων σφαιρικών HDL σωματιδίων που ήταν παρόμοια σε αριθμό με αυτά που σχηματίζονται σε επίμυες που εκφράζουν την πρωτεΐνη ελέγχου GFP. Οι αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και αποΑ-I(Arg149Ala) δημιούργησαν κυρίως preβ- και α4-HDL σωματίδια και οδήγησαν στον σχηματισμό ενός μείγματος δισκοειδών και σφαιρικών HDL σωματιδίων. Η αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> δημιούργησε υποπληθυσμούς σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών με κινητικότητα μεταξύ preβ and α-HDL και οδήγησε στο σχηματισμό κυρίως σφαιρικών αλλά και λίγων δισκοειδών σωματιδίων HDL.

Ταυτόχρονη χορήγηση αδενοϊών που εκφράζουν οποιαδήποτε από τις πέντε μεταλλαγμένες μορφές μαζί με αδενοϊούς που εκφράζουν την ανθρώπινη πρωτεΐνη LCAT επανέφερε σε φυσιολογικά επίπεδα την αποΑ-I, αύξησε σε κανονικά επίπεδα την HDL-χοληστερόλη και τον λόγο CE/TC του πλάσματος. Επίσης, οδήγησε στο σχηματισμό μόνο σφαιρικών σωματιδίων HDL που αποτελούνταν από υποπληθυσμούς α-HDL κινητικότητας.

Οι διακριτοί φαινότυποι που παρατηρήθηκαν από τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I, φανερώνει ότι οι αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> αναστέλλουν ένα πρώιμο βήμα της βιογένεσης της HDL που προηγείται του σχηματισμού δισκοειδών σωματιδίων HDL, και οφείλεται σε ανεπαρκή εστεροποίηση της χοληστερόλης των preβ-σωματιδίων. Αντιθέτως, οι μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala) και αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> αναστέλλουν ένα αργότερο βήμα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL που αναστέλλει την ωρίμανση των

δισκοειδών σωματιδίων σε σφαιρικά, λόγω ανεπαρκούς εστεροποίησης της χοληστερόλης των δισκοειδών σωματιδίων.

Η διόρθωση των παθολογικών φαινοτύπων της HDL, μετά από χορήγηση LCAT, υποδεικνύει πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την διόρθωση των χαμηλών επιπέδων HDL που οφείλονται σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις της apoA-I.

Σε άλλα πειράματα, μελετήθηκε ο ρόλος της καρβοξυτελικής περιοχής της apoA-I στην βιογένεση της HDL. Χρησιμοποιήθηκε μεταφορά μέσω αδενοϊών για μεταλλαγμένες μορφές με ελλείμματα στο καρβοξυτελικό άκρο της apoA-I, σε apoA-I<sup>-/-</sup> επίμυες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι τα επίπεδα της HDL του πλάσματος μειώθηκαν σε ποντίκια μολυσμένα με αδενοϊούς που εκφράζουν τις ελλειμματικές μορφές apoA-I[Δ(185-243)] και apoA-I[Δ(220-243)]. Αντίθετα, η HDL βρέθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα σε ποντίκια μολυσμένα με αδενοϊούς που εκφράζουν την ελλειμματική μορφή apoA-I[Δ(232-243)] ή την μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(E191A/H193A/K195A), η οποίες βρέθηκε ότι επάγουν ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης σε φυσιολογικά επίπεδα. Ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις έδειξε ότι οι ελλειμματικές μορφές apoA-I[Δ(185-243)] και apoA-I[Δ(220-243)] οδήγησαν στο σχηματισμό κυρίως preβ-HDL και λίγων σφαιρικών σωματιδίων που περιείχαν κυρίως apoE, ενώ η WT apoA-I, η apoA-I[Δ(232-243)] και η apoA-I(E191A/H193A/K195A) οδήγησαν στο σχηματισμό σφαιρικών σωματιδίων α-HDL. Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν ότι: (α) μορφές της apoA-I στις οποίες λείπει η περιοχή των αμινοξέων 220-231 εμποδίζουν το σχηματισμό α-HDL αλλά επιτρέπουν το σχηματισμό preβ-HDL σωματιδίων, *in vivo*, (β) η αμινοτελική περιοχή της apoA-I, 1-184, μπορεί να επάγει την σύνθεση preβ-HDL σωματιδίων, ανεξάρτητα από τον ABCA1, και (γ) τα φορτισμένα αμινοξέα της περιοχής 191-195 της apoA-I δεν φαίνεται να επηρεάζουν την βιογένεση της HDL.

Τέλος, για να μελετηθεί ο ρόλος συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών apoA-I και apoCIII κατασκευάστηκε μια σειρά ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν πυρηνικούς υποδοχείς και μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού TGFβ. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου της apoA-I του ανθρώπου μειώνεται, *in vivo*, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού TGFβ και συγκεκριμένα μέσω της πρωτεΐνης SMAD3.

## SUMMARY

In order to investigate how structural mutations in apoA-I affect the biogenesis and the plasma levels of high density lipoprotein (HDL) and explain the etiology of genetically determined low levels of HDL, I have generated recombinant adenoviruses expressing naturally occurring and bioengineered mutations of apolipoprotein A-I and studied their properties *in vitro* and *in vivo*.

The naturally occurring mutants apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> and apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> as well as the bioengineered mutant apoA-I(Arg149Ala) were secreted efficiently from cells in culture. The capacity of the mutant proteins to activate LCAT *in vitro* was greatly reduced to 0.41%, 2.07%, 28.4%, 2.7% and 5.2% of that of the WT apoA-I, respectively, *in vitro* and their ability to promote ABCA1-mediated cholesterol efflux from macrophages was similar to that of the WT apoA-I protein.

Gene transfer of the mutants in apoA-I deficient (apoA-I<sup>-/-</sup>) mice generated aberrant HDL phenotypes. Mice expressing the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> or apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> mutants had almost 90% decrease in plasma HDL-cholesterol and apoA-I levels (85% and 91% for apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, and 89% and 87% for apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, respectively), compared to those of mice expressing the WT apoA-I. apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(Arg149Ala) and apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> mutants had a reduction in HDL levels by 78%, 59% and 61% while the apoA-I levels were reduced by 68%, 64% and 55%, respectively, as compared to mice expressing the WT apoA-I.

The cholesteryl ester to total cholesterol (CE/TC) ratio of HDL from mice expressing any

of the five mutants was significantly decreased and the apoA-I was distributed in the HDL3 region. Similar experiments for the mutant apoA-I(Leu178Pro) showed no difference in the phenotype produced by the mutant compared to the one produced by the WT apoA-I.

The expression of mutants apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> or apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> in apoA-I<sup>-/-</sup> mice caused accumulation of pre $\beta$ 1-HDL and small size  $\alpha$ 4-HDL particles in the plasma and generated only few spherical HDL particles, similar in number to those formed by the control protein GFP. The mutants apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(Arg149Ala) promoted the formation of pre $\beta$ 1 and mainly  $\alpha$ 4-HDL subpopulations and gave a mixture of discoidal and spherical particles. Interestingly, apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> generated subpopulations of different sizes that migrate between pre $\beta$  and  $\alpha$ -HDL and formed mostly spherical and a few discoidal particles.

Simultaneous treatment of mice with adenoviruses expressing any of the five mutants and human LCAT normalized plasma apoA-I, HDL cholesterol levels and the CE/TC ratio. It also led to the formation of spherical HDL particles consisting mostly of  $\alpha$ -HDL subpopulations with slower electrophoretic mobility.

The study establishes that apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> inhibit an early step in the biogenesis of HDL due to inefficient esterification of the cholesterol of the pre $\beta$ 1-HDL particles by the endogenous LCAT. On the other hand, the mutants apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(Arg149Ala) and apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> inhibit a later step in the biogenesis of HDL due to inefficient esterification of the cholesterol of the discoidal particles.

The correction of the aberrant HDL phenotypes by treatment with LCAT suggests a

potential therapeutic intervention for HDL abnormalities that result from specific mutations in apoA-I.

Adenovirus-mediated gene transfer of C-terminal apoA-I mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice, showed that the plasma HDL levels were greatly reduced in mice expressing the carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[Δ(185-243)] and apoA-I[Δ(220-243)], shown previously to diminish the ABCA1-mediated lipid efflux. The HDL levels were normal in mice expressing the WT apoA-I, the apoA-I[Δ(232-243)] deletion mutant or the apoA-I[E191A/H193A/K195A] point mutant, which promote normal ABCA1-mediated lipid efflux. EM and 2D gel electrophoresis analyses showed that the apoA-I[Δ(185-243)] and apoA-I[Δ(220-243)] mutants formed mainly preβ-HDL particles and few spherical particles enriched in apoE, while WT apoA-I, apoA-I[Δ(232-243)] and apoA-I[E191A/H193A/K195A] formed spherical α-HDL particles. The findings establish that (a) deletions that eliminate the 220-231 region of apoA-I prevent the synthesis of α-HDL but allow the synthesis of preβ-HDL particles *in vivo*, (b) the amino-terminal segment 1-184 of apoA-I can promote synthesis of preβ-HDL-type particles in an ABCA1-independent process, and (c) the charged residues in the 191-195 region of apoA-I do not influence the biogenesis of HDL.

Finally, in order to elucidate the contribution of different transcription factors to the regulation of apoA-I and apoCIII genes we used a series of recombinant adenoviruses expressing nuclear receptors and members of the TGFβ signaling pathway. Preliminary results indicated that human apoA-I gene expression is negatively regulated, *in vivo*, by the TGFβ signaling pathway and specifically through SMAD3 protein.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>ΟΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ</b> .....	<b>2</b>
<b>ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ</b> .....	<b>6</b>
<i>LPL (Lipoprotein Lipase, Λιποπρωτεϊνική Λιπάση)</i> .....	6
<i>HL (Hepatic Lipase, Ηπατική Λιπάση)</i> .....	8
<i>EL (Endothelial Lipase, Ενδοθηλιακή Λιπάση)</i> .....	8
<i>LCAT (Lecithin:Cholesterol Acyl-Transferase, Μεταφορέας Ακυλομάδας Λεκιθίνης:Χοληστερόλης)</i> ..	9
<i>CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein, Πρωτεΐνη Μεταφοράς Εστέρων Χοληστερόλης)</i> .....	9
<i>PLTP (Phospholipid Transfer Protein, Πρωτεΐνη Μεταφορέας Φωσφολιπιδίων)</i> .....	10
<b>Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Α-I</b> .....	<b>11</b>
<i>Το γονίδιο της apoA-I</i> .....	11
<i>Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της apoA-I</i> .....	11
<i>Η απολιποπρωτεΐνη A-I</i> .....	14
<b>Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Α-I ΚΑΙ Η HDL</b> .....	<b>20</b>
<i>Σχηματισμός δισκοειδών σωματιδίων</i> .....	20
<i>Προσθήκη λιπιδίων στην φτωχή-λιπιδίων apoA-I και σχηματισμός νεοσυτιθέμενης (nascent) HDL</i> ...	24
<b>Ο ΜΕΤΑΦΟΡΕΑΣ ABCA1</b> .....	<b>25</b>
<i>Σταθερότητα του ABCA1</i> .....	29
<i>Ρύθμιση της έκφρασης του ABCA1</i> .....	30
<i>Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις του ABCA1 με την apoA-I</i> .....	31
<i>Μοντέλο έμμεσης αλληλεπίδρασης</i> .....	31
<i>Το υβριδικό μοντέλο πρόσδεσης-αλληλεπίδρασης και το μοντέλο δύο θέσεων πρόσδεσης</i> .....	33
<i>Μοντέλο άμεσης αλληλεπίδρασης</i> .....	33
<i>Αναδιοργάνωση της HDL από τους ABCG1 και ABCG4</i> .....	35
<b>Ο SR-BI (SCAVENGER RECEPTOR CLASS B, TYPE I)</b> .....	<b>36</b>
<b>ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ HDL</b> .....	<b>37</b>

<i>Μετασχηματισμός δισκοειδούς HDL σε σφαιρική από το ένζυμο LCAT</i> .....	38
<i>Αλληλεπιδράσεις της apoA-I και της LCAT</i> .....	38
<b>ΑΝΤΙ-ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ HDL</b> .....	41
<i>Αθηροματωγόνος HDL (ή αλλιώς η «κακή» καλή-χοληστερόλη)</i> .....	41
<i>Ανάγκη προσδιορισμού δεικτών για τις ιδιότητες της HDL. Η κλινική δοκιμή ILLUMINATE</i> .....	42
<i>Η δράση της μυελο-υπεροξειδάσης (MPO) στην apoA-I</i> .....	43
<b>ΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</b> .....	45
<b>ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΗΣ HDL ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ</b> .....	46
<b>ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I</b> .....	49
<i>ΑποA-I και Αμυλοείδωση</i> .....	49
<i>Μεταλλάξεις της ΑποA-I επηρεάζουν την ωρίμανση της HDL</i> .....	50
Η apoA-I(Leu141Arg) <sub>Pisa</sub> .....	50
Η apoA-I(Arg151Cys) <sub>Paris</sub> .....	55
Η apoA-I(Leu159Arg) <sub>FIN</sub> .....	58
Η apoA-I(Leu178Pro).....	63
Η apoA-I(Arg160Leu) <sub>Oslo</sub> .....	65
Η τεχνητή μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Arg149Ala).....	67
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	73
<b>ΥΛΙΚΑ</b> .....	74
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	75
<i>Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)</i> .....	75
<i>Αντίδραση με ένζυμα περιορισμού (πέψη)</i> .....	76
<i>Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)</i> .....	76
<i>Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων E.coli DH5a</i> .....	77
<i>Κυτταροκαλλιέργειες</i> .....	77
<i>Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)</i> .....	78
<i>Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης κατά Western</i> .....	79

<i>Δημιουργία του πλασμιδίου pCDNA3.1-apoA1g-ΔBgIII</i> .....	80
<i>Δημιουργία των μεταλλάξεων στο γονίδιο της apoA-I</i> .....	84
<i>Ηλεκτροπόρωση κυττάρων και επιλογή ανασυνδρασμένων πλασμιδίων</i> .....	87
<i>Κατασκευή ανασυνδρασμένων αδενοϊών</i> .....	89
<i>Δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών (Plaque assay)</i> .....	91
<i>Έκφραση και έκκριση της αγρίου τύπου (WT) και των μεταλλαγμένων μορφών της apoA-I</i> .....	92
<i>Παραγωγή της WT και των μεταλλαγμένων μορφών της apoA-I χρησιμοποιώντας το σύστημα των ανασυνδρασμένων αδενοϊών</i> .....	92
<i>Απομόνωση και καθαρισμός της WT και των μεταλλαγμένων μορφών της apoA-I</i> .....	93
<i>Εξόδος χοληστερόλης μέσω ABCA1</i> .....	94
<i>Κατασκευή ανασυνδρασμένης HDL (rHDL)</i> .....	96
<i>Δοκιμή ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT</i> .....	97
<i>Εκτίμηση της LCAT-ενεργότητας πλάσματος ποντικών</i> .....	99
<i>Μελέτες σε μοντέλα ζώων</i> .....	100
<i>Απομόνωση πλάσματος από αίμα επίμων</i> .....	100
<i>Μετρήσεις επιπέδων λιπιδίων και απολιποπρωτεΐνης A-I στο πλάσμα επίμων</i> .....	101
<i>Χρωματογραφία διήθησης υγρής στοιβάδας (FPLC)</i> .....	101
<i>Κλασμάτωση πλάσματος μέσω υπερφυγοκέντρωσης σε κλίση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου</i> .....	102
<i>Ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (EM) των κλασμάτων που περιέχουν πρωτεΐνη apoA-I</i> .....	102
<i>Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D)</i> .....	103
<i>Απομόνωση RNA και ανάλυση κατά Northern</i> .....	104
<i>Ανιχνευτές επιπέδων έκφρασης mRNA (probes)</i> .....	105
<i>Υβριδοποίηση των ανιχνευτών (probes) με το RNA</i> .....	106
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>108</b>
<b>Α) IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΔΟΜΗΣ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I</b> .....	<b>109</b>
<b><i>A1. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ LCAT ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΑ-I, IN VIVO</i></b> .....	<b>109</b>



I. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ .....	109
II. <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I.....	123
III. <i>IN VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I .....	129
IV. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝ-ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ LCAT ΣΤΟΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I	144
<b>A2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I ΜΕ ΤΟΝ ABCA1, <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>157</b>
Η ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I, ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ABCA1-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ Α-HDL ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΩΝ PREB-HDL ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ, <i>IN VIVO</i> .....	157
<b>B) ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟΑ-I ΚΑΙ ΑΠΟΣΠ ΕΧ</b>	
<b>VIVO ΚΑΙ IN VIVO .....</b>	<b>159</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>171</b>
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ .....	186
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>188</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ .....</b>	<b>230</b>

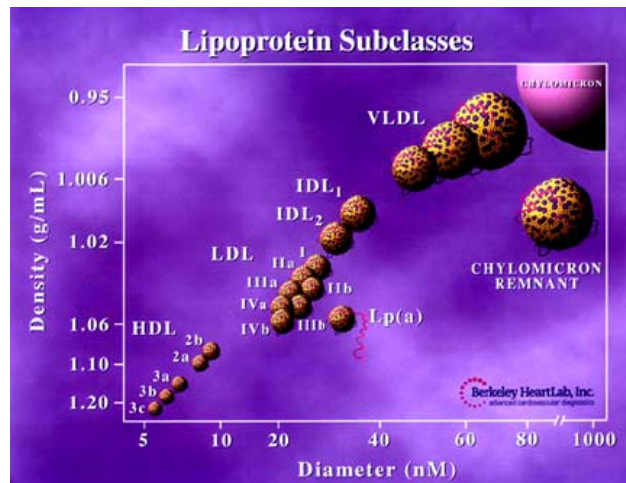
# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## ΟΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ

Η μεταφορά και ανακατανομή ελεύθερης χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων και άλλων λιπιδίων μέσω της κυκλοφορίας επιτυγχάνεται με το πακετάρισμά τους σε μακρομοριακά, υδατοδιαλυτά συμπλέγματα, τις λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος σχηματίζουν δισκοειδή και σφαιρικά σωματίδια. Τα δισκοειδή σωματίδια αποτελούνται κυρίως από πολικά μόρια λιπιδίων (φωσφολιπίδια, χοληστερόλη) και πρωτεϊνών σε μορφή διπλοστοιβάδας (bilayer). Ο πυρήνας των σφαιρικών σωματιδίων αποτελείται από μη πολικά ουδέτερα λιπαρά που είναι εστέρες χοληστερόλης (cholesterol esters, CE) και τριγλυκερίδια (triglycerides, TG), και περιβάλλεται από πολικά μόρια όπως φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και πρωτεΐνες.

Η διαφορά στη σύσταση των σωματιδίων σε πρωτεΐνες και λιπίδια τα κάνει να διαφέρουν σε μέγεθος και πυκνότητα (**Πίνακας I** και **Εικόνα 1**). 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 παραδοσιακά χωρίζονται σε πέντε κύριες κατηγορίες με βάση την πυκνότητα τους που καθορίζεται από την επίπλευσή τους σε διαβάθμιση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου μετά από υπερφυγοκέντρωση. Οι κατηγορίες είναι οι εξής: χυλομικρά (chylomicrons), λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoproteins, VLDL), λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (intermediate-density lipoprotein, IDL), λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoproteins, LDL) και λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (high-density lipoproteins, HDL) (Gotto, Jr. et al. 1986). Κάθε κατηγορία λιποπρωτεϊνών εμφανίζει ετερογένεια μεγέθους και σύστασης και μπορεί να

Πίνακας Ι. Σύνθεση και ιδιότητες των κυριότερων λιποπρωτεϊνών του πλάσματος Βασισμένος στους (Zannis et al. 2004b)							
Σωματίδια	Πηγή	Πυκνότητα (g/ml)	Πρωτεΐνη (%)	ΤΓ (%)	Φωσφ. (%)	Εστ.Χολ. (%)	Χολ. (%)
Χυλομικρά	Έντερο	<0.94	1-2	80-95	3-6	2-4	1-3
VLDL	Ήπαρ	0.94 -1.006	6-10	45-65	15-20	16-22	4-8
IDL	VLDL	1.006-1.019	10-12	25-30	25-27	32-35	8-10
LDL	VLDL	1.019-1.063	18-22	4-8	18-28	45-55	6-8
HDL <sub>2</sub>	Έντερο, ήπαρ (χυλομικρά και VLDL)	1.063-1.125	33-35	2-7	32-43	20-30	5-10
HDL <sub>3</sub>	Έντερο, ήπαρ (χυλομικρά και VLDL)	1.125-1.210	55-57	3-13	26-46	15-30	2-6
Lp(a)	Ήπαρ	1.040-1.090	~32	~1	~22	~37	~8



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων υποπληθυσμών των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος όπως αυτές διαχωρίζονται με βάση τη διάμετρο τους (diameter) σε nm και την πυκνότητά επίπλευσής τους (density) σε g/ml (Berkeley HeartLab, Inc.)

διαχωριστεί σε υποπληθυσμούς με διάφορες τεχνικές.

Οι λιποπρωτεΐνες συντίθενται και καταβολίζονται με βάση τρία διαφορετικά αλλά μεταβολικώς αλληλεπιδρώντα μονοπάτια: το μονοπάτι των χυλομικρών, το μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL και το μονοπάτι της HDL. Ο σχηματισμός των χυλομικρών και της VLDL γίνεται ενδοκυτταρικά ενώ της HDL εξοκυτταρικά (Zannis et al. 2006; Tall et al. 2001; Kane and Havel 1989).

Κατά το μονοπάτι των χυλομικρών, η σύνθεσή τους γίνεται στο έντερο. Μετά από κατανάλωση τροφής τα λιπίδια συγκροτούνται μαζί με την απολιποπρωτεΐνη B-48 στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου για να σχηματίσουν τα χυλομικρά. Τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα από τα σωματίδια των λιποπρωτεϊνών και έχουν την μικρότερη πυκνότητα ( $d < 0.94$  g/ml) μιας και περιέχουν πολλά τριγλυκερίδια και μικρό ποσοστό πρωτεϊνών (< 2%). Τόσο η apoB-48 όσο και η MTP είναι αναγκαίες για την ενδοκυττάρια συναρμολόγηση των χυλομικρών. Για την έκκριση τους στο λεμφικό σύστημα χρειάζεται η πρωτεΐνη μεταφοράς τριγλυκεριδίων MTP (microsomal triglyceride transfer protein). Μετά την έκκρισή τους η λιποπρωτεϊνική λιπάση (Lipoprotein Lipase, LPL) υδρολύει τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση εντοπίζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών αγγείων και ενεργοποιείται από την απολιποπρωτεΐνη CII (apoCII). Η δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης δημιουργεί τα πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης υπολείματα χυλομικρών (chylomicron remnants) τα οποία φέρουν απολιποπρωτεΐνη E στην επιφάνειά τους και απομακρύνονται από το πλάσμα μέσω υποδοχέων της LDL στο ήπαρ. Χυλομικρά δεν σχηματίζονται στην περίπτωση ομόζυγης υπο-βητα-

λιποπρωτεϊναιμίας που προκαλεί η έλλειψη της B-48, ή α-βήτα-λιποπρωτεϊναιμίας που οφείλεται στην έλλειψη MTP (Kane and Havel 1989; Berriot-Varoqueaux et al. 2000).

Η συναρμολόγηση της LDL λαμβάνει χώρα στο ήπαρ. Στο μονοπάτι βιογένεσης της LDL, η αποB-100 συνδυάζεται ενδοκυτταρικά στα ηπατοκύτταρα με λιπίδια, μέσω της δράσης της MTP, για να σχηματίσει VLDL. Μετά την έκκριση της VLDL στο πλάσμα τα τριγλυκερίδια της υδρολύονται από την LPL και παράγονται σωματίδια IDL. Τα σωματίδια IDL μετατρέπονται σε LDL μέσω περαιτέρω υδρόλυσης των λιπιδίων τους από την ηπατική λιπάση (hepatic lipase, HL). Τόσο τα IDL, όσο και τα LDL σωματίδια, αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα της LDL (LDLr) που συμβάλλει στον καταβολισμό τους, κυρίως στο ήπαρ. Αυξημένη ποσότητα LDL στο πλάσμα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης (Anderson et al. 1991). Ασθένειες που σχετίζονται με το μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL είναι η ομόζυγη υπο-βήτα-λιποπρωτεϊναιμία, η οικογενής τριγλυκεριδαιμία και η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (Kane and Havel 2001; Brunzell and Deeb 2001; Goldstein et al. 2001).

Η βιογένεση της HDL συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ μέσω ενός πολύπλοκου μονοπατιού. Αρχικά η απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I) εκκρίνεται κυρίως ελεύθερη λιπιδίων από το ήπαρ και αποκτά φωσφολιπίδια και χοληστερόλη μέσω αλληλεπιδράσεων της με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 (ATP-binding cassette A1). Μέσω ενδιάμεσων βημάτων που δεν είναι απολύτως γνωστά ακόμα, η αποA-I αποκτά σταδιακά περισσότερα λιπίδια και σχηματίζει δισκοειδή σωματίδια τα οποία, με την δράση του ενζύμου ακυλ-τρανφεράση λεκιθίνης:χοληστερόλης (LCAT: Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase), μετατρέπονται σε σφαιρικά (**Εικόνα 2**). Τόσο η δισκοειδής όσο και η σφαιρική μορφή της HDL αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της HDL,

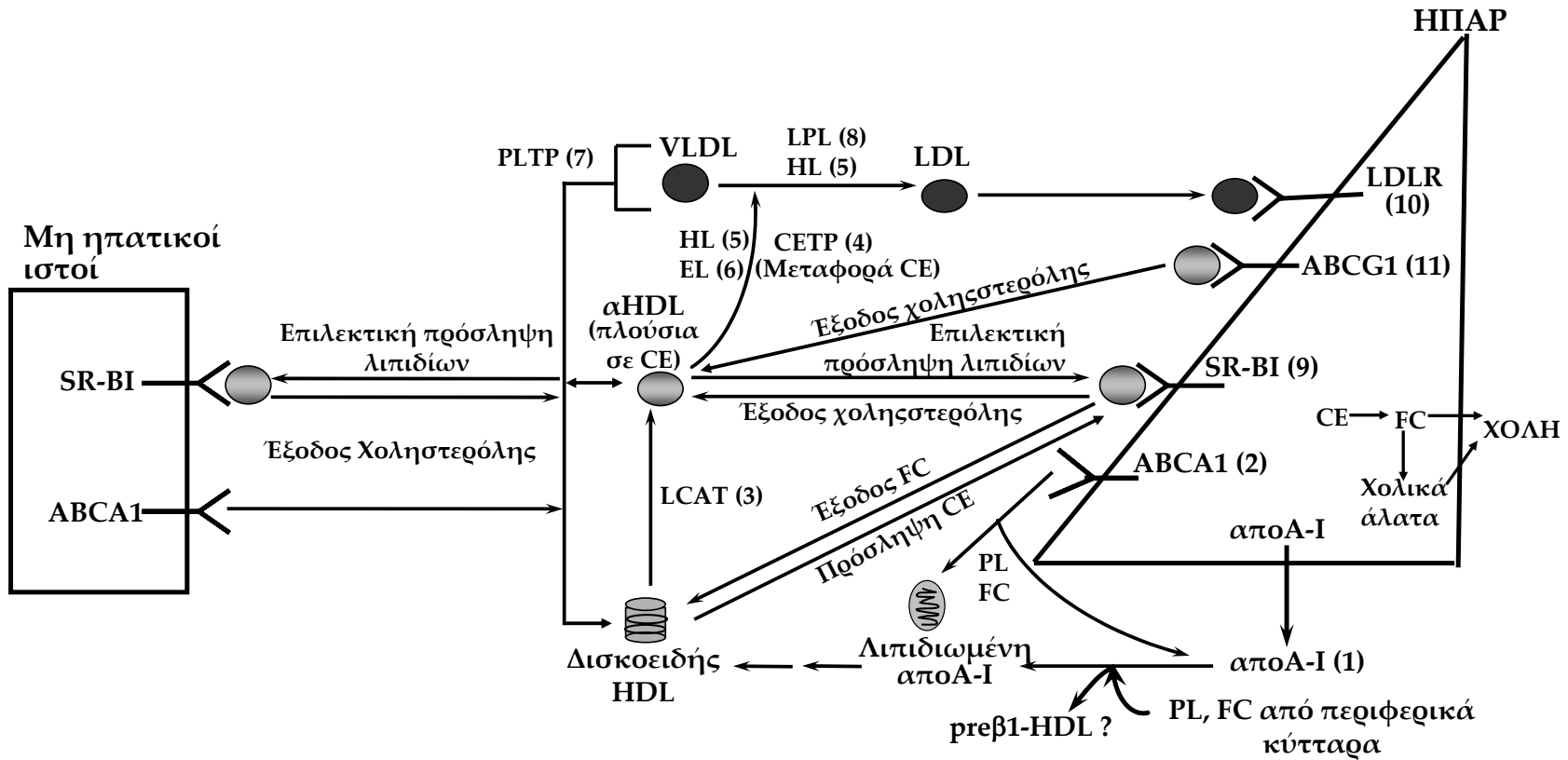
SRBI (scavenger receptor class B type I). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές φαίνεται να είναι σημαντικές για την αντιαθηρωματική δράση της HDL. Στα επόμενα βήματα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL συμπεριλαμβάνεται η μεταφορά εστέρων χοληστερόλης στα VLDL/LDL στην HDL, η υδρόλυση τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων από την λιποπρωτεϊνική λιπάση και την ηπατική λιπάση και η μεταφορά φωσφολιπιδίων από τα VLDL/LDL στην HDL, μέσω της δράσης του ενζύμου μεταφοράς φωσφολιπιδίων, PLTP (phospholipid transfer protein). Ασθένειες που σχετίζονται με το μονοπάτι αυτό είναι η έλλειψη αποA-I, η νόσος Tangier (Tangier disease) που οφείλεται σε μεταλλάξεις στον ABCA1, η κλασική έλλειψη LCAT και η ασθένεια «fish-eye disease» που οφείλεται σε μεταλλάξεις της LCAT και στην οποία οι ασθενείς εμφανίζουν θόλωση του αμφιβληστροειδή (corneal opacity) (Tall et al. 2001; Brunzell and Deeb 2001; Santamarina-Fojo et al. 2001; Assmann et al. 2001).

## **ENZYMATA KAI ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ**

Όπως αναφέρθηκε, μετά την σύνθεσή τους, οι λιποπρωτεΐνες υφίστανται μετατροπές στο πλάσμα από την δράση ενζύμων του πλάσματος και πρωτεϊνών μεταφοράς λιπιδίων. Οι μετατροπές αυτές είναι πολύ σημαντικές για την λειτουργία και τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Τα σημαντικότερα ένζυμα που δρουν στις διάφορες λιποπρωτεΐνες είναι τα εξής:

### **LPL (Lipoprotein Lipase, Λιποπρωτεϊνική Λιπάση)**

Η LPL είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό, τον καρδιακό και γραμμωτό μυϊκό ιστό και στα μακροφάγα κύτταρα. Καταλύει την υδρόλυση κυρίως των 1- και 3- εστερικών δεσμών των τριγλυκεριδίων στα χυλομικρά και τα VLDL



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



σωματίδια, δημιουργώντας ελεύθερα λιπαρά οξέα και κυρίως 2-μονογλυκερίδια. Η LPL μετά την έκκρισή της από τους διάφορους ιστούς, προσδένεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω περιοχών πρόσδεσης ηπαρίνης. Η LPL ενεργοποιείται από την apoC-II. Η απώλεια της LPL ή της apoC-II σχετίζονται με οξεία υπερτριγλυκεριδαιμία (Brunzell and Deeb 2001)

#### **HL** (Hepatic Lipase, Ηπατική Λιπάση)

Η HL είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ. Εκκρίνεται και προσδένεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων του ήπατος. Υδρολύει μόνο και διακυλογλυκερόλες και φωσφολιπίδια των IDL και HDL, δημιουργώντας λιποπρωτεΐνες μεγαλύτερης πυκνότητας. *In vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η HL υδρολύει μεγάλα, πλούσια σε apoE, HDL σωματίδια (Brunzell and Deeb 2001).

Έλλειψη της HL στον άνθρωπο και σε μοντέλα ζώων σχετίζεται με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων στις IDL και HDL. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου. Αυξημένη δραστηριότητα της HL σχετίζεται με μικρού μεγέθους και μεγάλης πυκνότητας LDL και με μειωμένη HDL2 (Brunzell and Deeb 2001).

#### **EL** (Endothelial Lipase, Ενδοθηλιακή Λιπάση)

Η EL είναι δομικά και λειτουργικά παρόμοια με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των λιπασών. Η EL έχει κυρίως δράση φωσφολιπάσης και περιορισμένη δράση λιπάσης τριγλυκεριδίων (Jaye et al. 1999; Hirata et al. 1999; Rader and Jaye 2000). Εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα, το ήπαρ και άλλους ιστούς

συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, των νεφρών, των όρχεων και του πλακούντα. Διαγονιδιακοί επίμυες που εκφράζουν EL εμφανίζουν δραματική μείωση στην HDL-χοληστερόλη (Ishida et al. 2003), ενώ επίμυες με έλλειψη της EL εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα HDL (Ma et al. 2003). Σε επίμυες με ταυτόχρονη έλλειψη της EL και της αποE ( $EL^{-/-}/\text{apoE}^{-/-}$ ) ομάδα ερευνητών παρατήρησε μείωση της αθηροσκλήρωσης (Ishida et al. 2004), ενώ άλλη ομάδα ερευνητών σε παρόμοια πειράματα δεν παρατήρησε διαφορές στα επίπεδα αθηροσκλήρωσης τόσο σε  $EL^{-/-}/\text{apoE}^{-/-}$  όσο και σε  $EL^{-/-}/LDLR^{-/-}$  επίμυες (Ko et al. 2005), (και τα δύο αποτελούν μοντέλα υπερ-λιποπρωτεϊναιμίας). Και οι δύο ομάδες όμως, ανέφεραν ότι η έλλειψη της EL αυξάνει τα επίπεδα της HDL.

**LCAT** (Lecithin:Cholesterol Acyl-Transferase, Μεταφορέας Ακυλομάδας Λεκιθίνης:Χοληστερόλης)

Η LCAT είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στο ήπαρ. Αφού εκκριθεί, εντοπίζεται με την HDL και την LDL. Είναι υπεύθυνη για την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης της HDL και της LDL, χρησιμοποιώντας την ακυλομάδα στην θέση C-2 της λεκιθίνης (Assmann et al. 2001). Ο ρόλος της LCAT στην βιογένεση της HDL αναπτύσσεται σε επόμενο κεφάλαιο.

**CETP** (Cholesterol Ester Transfer Protein, Πρωτεΐνη Μεταφοράς Εστέρων Χοληστερόλης)

Η CETP είναι μια ιδιαίτερα υδρόφοβη γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στο ήπαρ, το λεπτό έντερο και διάφορα άλλα όργανα. Καταλύει την ανταλλαγή ουδέτερων λιπιδίων, κυρίως τριγλυκεριδίων και εστέρων χοληστερόλης, μεταξύ όλων των τύπων λιποπρωτεϊνών

(Zannis et al. 1993). Στην κυκλοφορία, η CETP επάγει την μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL στα VLDL/IDL/LDL σωματίδια (Barter et al. 2003). Έλλειψη της CETP στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα HDL (Inazu et al. 1990). Λεπτομέρειες για τους αναστολείς του ενζύμου CETP και την χρήση τους σε πρόσφατες κλινικές δοκιμές αναπτύσσονται σε επόμενο κεφάλαιο.

### **PLTP (Phospholipid Transfer Protein, Πρωτεΐνη Μεταφορέας Φωσφολιπιδίων)**

Η PLTP είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται κυρίως από το ήπαρ και τον λιπώδη ιστό. Καταλύει την μεταφορά φωσφολιπιδίων από την VLDL στην HDL και την μετατροπή HDL3 σωματιδίων σε HDL2, ενώ δεν μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης ή τριγλυκερίδια (Lusa et al. 1996; Liang et al. 1994; Huuskonen et al. 2001). Επίμυες με έλλειψη της PLTP παρουσιάζουν σημαντική μείωση της HDL (Jiang et al. 1999) ενώ σε επίμυες με έλλειψη της apoE, παράλληλη έλλειψη της PLTP συσχετίστηκε με μειωμένη αθηροσκλήρωση (Jiang et al. 2001). Η δράση της PLTP παρουσιάζεται αυξημένη στο διαβήτη και στην παχυσαρκία.

## **Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Α-I**

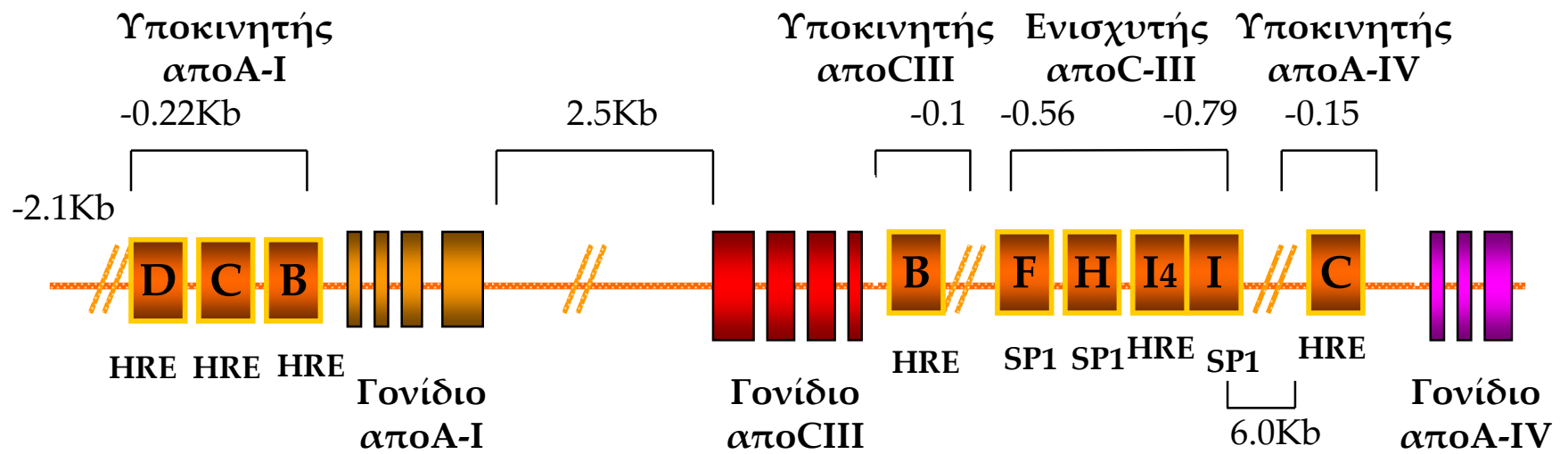
Η αποΑ-I είναι η βασική πρωτεΐνη της HDL, ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT και επάγει την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα. Ασθενείς που πάσχουν από έλλειψη της αποΑ-I και μοντέλα ποντικών για την έλλειψη αυτή δεν σχηματίζουν HDL σωματίδια στο πλάσμα (Matsunaga et al. 1991; Williamson et al. 1992).

### **Το γονίδιο της αποΑ-I**

Το γονίδιο APOA1 έχει μέγεθος 1863 ζεύγη βάσεων (bp: base pairs) και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (Karathanasis et al. 1983b). Χαρτογράφηση του γονιδίου της αποΑ-I έδειξε ότι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 του ανθρώπου, στο ίδιο σύμπλεγμα με τα γονίδια της απολιποπρωτεΐνης CIII και A-IV και σε απόσταση 2.5 Kb και 7.5 Kb, αντίστοιχα, μεταξύ τους (Karathanasis et al. 1983a; Cheung et al. 1984). Στον επίμυ (ποντικό) το γονίδιο της αποΑ-I εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9 (Lusis et al. 1983).

### **Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της αποΑ-I**

Η αποΑ-I συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και το λεπτό έντερο. Η ηπατική έκφραση του γονιδίου ελέγχεται από 3 ρυθμιστικά στοιχεία, το B [-128 ως -77 ζεύγη βάσεων (bp)], C (-175 έως -148 bp) και D (-220 έως -190 bp) του υποκινητή της αποΑ-I (**Εικόνα 3**). Η μεταγραφή της αποΑ-I επάγεται από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του HNF (hepatic nuclear factor), όπως ο HNF4α. Οι παράγοντες αυτοί καθώς και άλλοι ορφανοί υποδοχείς της οικογένειας των COUP-TFs (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors) όπως οι ARP-1, EAR-2 και EAR-3 αλλά και ομοδιμερή



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση του συμπλέγματος γονιδίων apoA-I/apoCIII/apoA-IV του ανθρώπου. Με γραμματα συμβολίζονται οι περιοχές των ρυθμιστικών αλληλουχιών των γονιδίων. Σημειώνονται οι αποστάσεις από την περιοχή εκκίνησης της μεταγραφής των γονιδίων, όπως αναφέρονται στο κείμενο.

του πυρηνικού υποδοχέα RXRα ή ετεροδιμερή του ίδιου με τους υποδοχείς RARα ή T<sub>3</sub>Rβ, προσδένονται σε πολλαπλές περιοχές στον υποκινητή του γονιδίου της αποΑ-I (Tzamelis and Zannis 1996; Harnish et al. 1996; Ge et al. 1994). Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται σε επαναλήψεις τύπου DR (direct repeat) μιας ρυθμιστικής αλληλουχίας (τυπική αλληλουχία είναι η 5'-AGGTCA-3') διαχωριζόμενες από μία ή δύο νουκλεοτιδικές βάσεις (τύπος DR-1 και DR-2, αντίστοιχα).

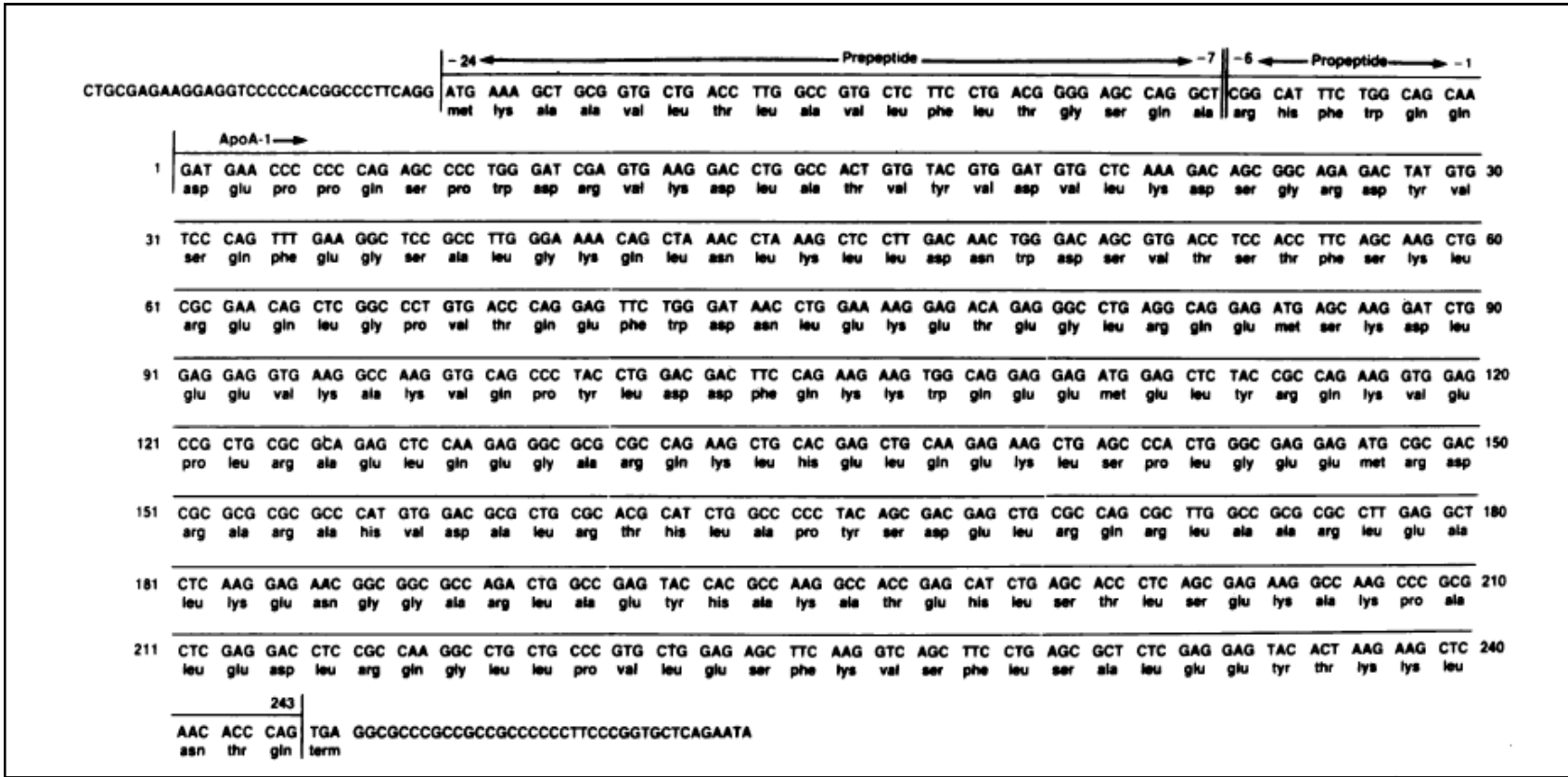
Η μεταγραφή του γονιδίου της αποΑ-I επηρεάζεται ισχυρά από την περιοχή του ενισχυτή που εντοπίζεται στην περιοχή -790 έως -560 του υποκινητή του γονιδίου της αποC-III (Zannis et al. 2001; Kan et al. 2004). Η περιοχή αυτή φέρει περιοχές απόκρισης σε ορμόνες ή HREs (hormone response elements) και περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SP-1 (Talianidis et al. 1995; Kardassis et al. 1997) (**Εικόνα 3**). Μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών έδειξαν ότι η περιοχή του ενισχυτή είναι απαραίτητη για την έκφραση του γονιδίου της αποΑ-I και της αποC-III στο έντερο και τους νεφρούς ενώ ενισχύει την ηπατική έκφρασή τους (Kan et al. 2000). Άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς όπως ο FXR (farnesoid X receptor), LXR (liver X receptor) και PPARα (peroxisomal proliferation activating receptor-alpha) συμβάλουν στην μεταγραφική ρύθμιση της αποΑ-I (Claudel et al. 2002; Huuskonen et al. 2006; Berthou et al. 1996). Αγωνιστές (agonists) του PPARα είναι οι φιβράτες (fibrates) που έχουν όμως μέτρια αποτελεσματικότητα στην αύξηση των επιπέδων της αποΑ-I στο πλάσμα του ανθρώπου. Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας LRH-1 (liver receptor homolog-1) επάγει την μεταγραφή του γονιδίου της αποΑ-I με άμεση πρόσδεση στον υποκινητή του γονιδίου της αποΑ-I (Delerive et al. 2004).

## Η απολιποπρωτεΐνη A-I

Η αλληλουχία του cDNA της αποA-I αποτελείται από 878 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν για 267 αμινοξέα (Cheung and Chan 1983). Η προ-προ-αποA-I (preproapoA-I) περιέχει ένα προ-πεπτίδιο 18-αμινοξέων και ένα πρό-πεπτίδιο 6-αμινοξέων στο αμινοτελικό κομμάτι του πολυπεπτιδίου της ώριμης αποA-I η οποία αποτελείται από 243 αμινοξέα (Zannis et al. 1983; Law and Brewer, Jr. 1984). Η αλληλουχία της αποA-I φαίνεται στη **Εικόνα 4**.

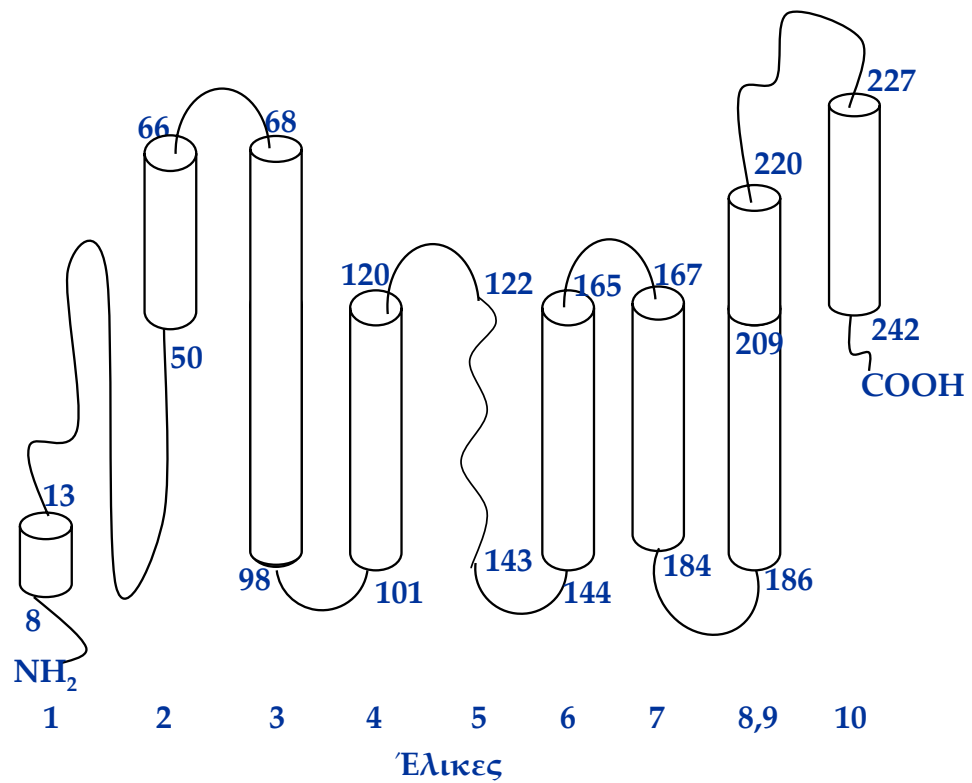
Η αποA-I αποτελείται από επαναλήψεις 22- και 11- αμινοξέων που με βάση την ανάλυση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και μέσω υπολογιστικών μοντέλων, οργανώνονται σε αμφιπαθικές α-έλικες (Nolte and Atkinson 1992; Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999; Segrest et al. 1999). Στην **Εικόνα 5** φαίνεται σχηματικά η δευτεροταγής δομή της αποA-I όπως προβλέπεται από την αμινοξική αλληλουχία της. Η κατανομή των αμινοξέων όπως προβλέπεται κατά τον τροχό του Edmundson (Edmundson wheel) για τις έλικες 2-8 και την έλικα 10 φαίνονται στην **Εικόνα 6** (Frank and Marcel 2000). Η κρυσταλλική δομή σε ανάλυση 3.6 Å, μιας ελλειματικής μορφής της αποA-I ελεύθερης λιπιδίων, έδειξε ότι η αποA-I(Δ1-43), εκτός της περιοχής που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 220 και 227, αποτελείται από μια σχεδόν συνεχή αμφιπαθική α-έλικα. Αυτή η δομή του μορίου επιτρέπει την διαμόρφωση του μορίου σε σχήμα πετάλου με διαστάσεις 125x80x40 Å (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999).

Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε η κρυσταλλική δομή της πλήρους-μήκους αποA-I σε ανάλυση 2.4 Å (Ajees et al. 2006). Χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα άλατος [500 μM Cr(III)-Tris-acetylacetonate (Cr-acac<sub>3</sub>)] οι ερευνητές αυτοί κατάφεραν να σταθεροποιήσουν την δομή της αποA-I σε κατάσταση ελεύθερης λιπιδίων.

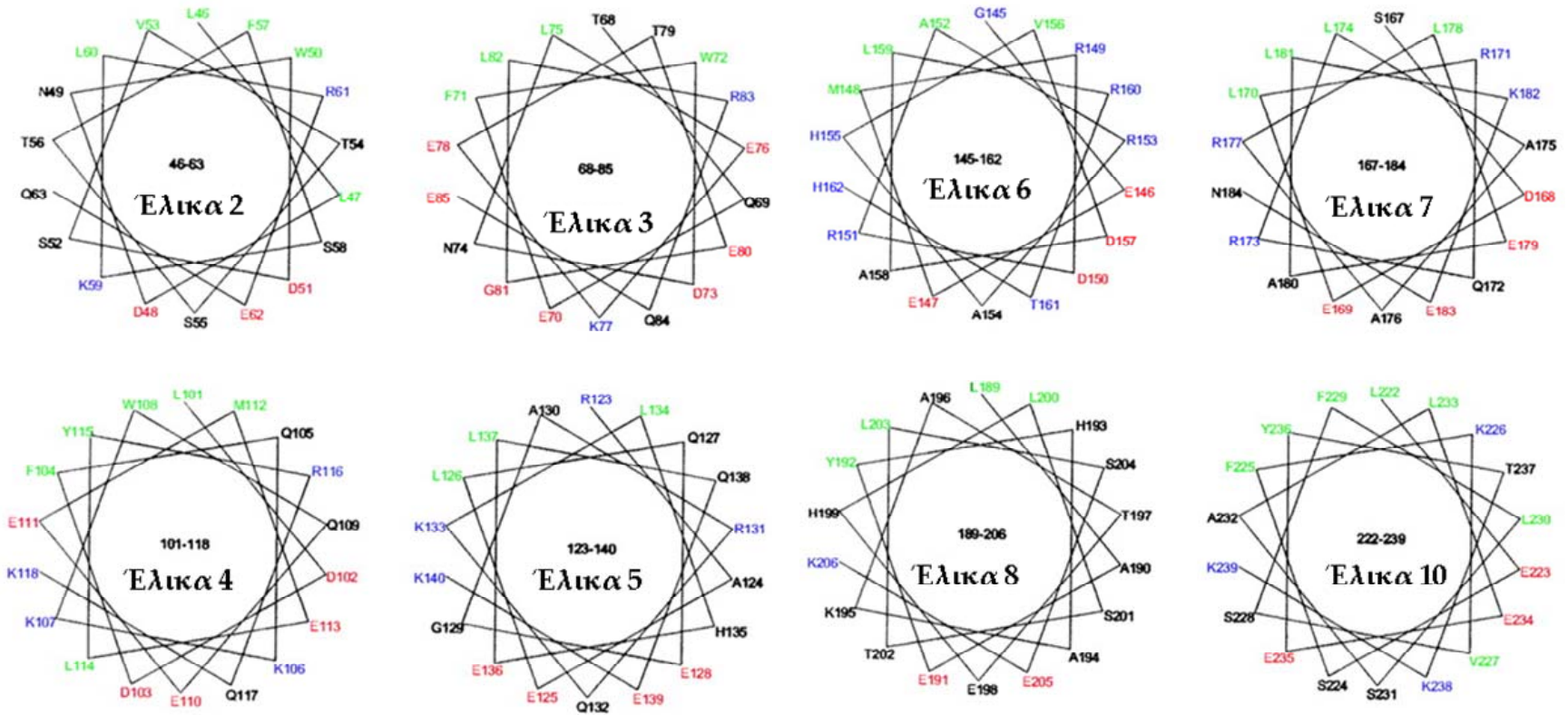


Εικόνα 4. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία σε αντιστοίχιση με την αλληλουχία των 267 αμινοξέων της ανθρώπινης προ-προ-αποΑ-I, όπως προέκυψε από ανάλυση του cDNA της αποΑ-I (Law and Brewer, Jr. 1984). Διακρίνονται τα κωδικόνια έναρξης (ATG, met) και λήξης (TGA, term). Η θετική αρίθμηση των αμινοξέων αρχίζει στο πρώτο αμινοξύ της αλληλουχίας της ώριμης αποΑ-I πρωτεΐνης και με βάση αυτήν αναφέρεται η θέση των αμινοξέων στην παρούσα μελέτη.



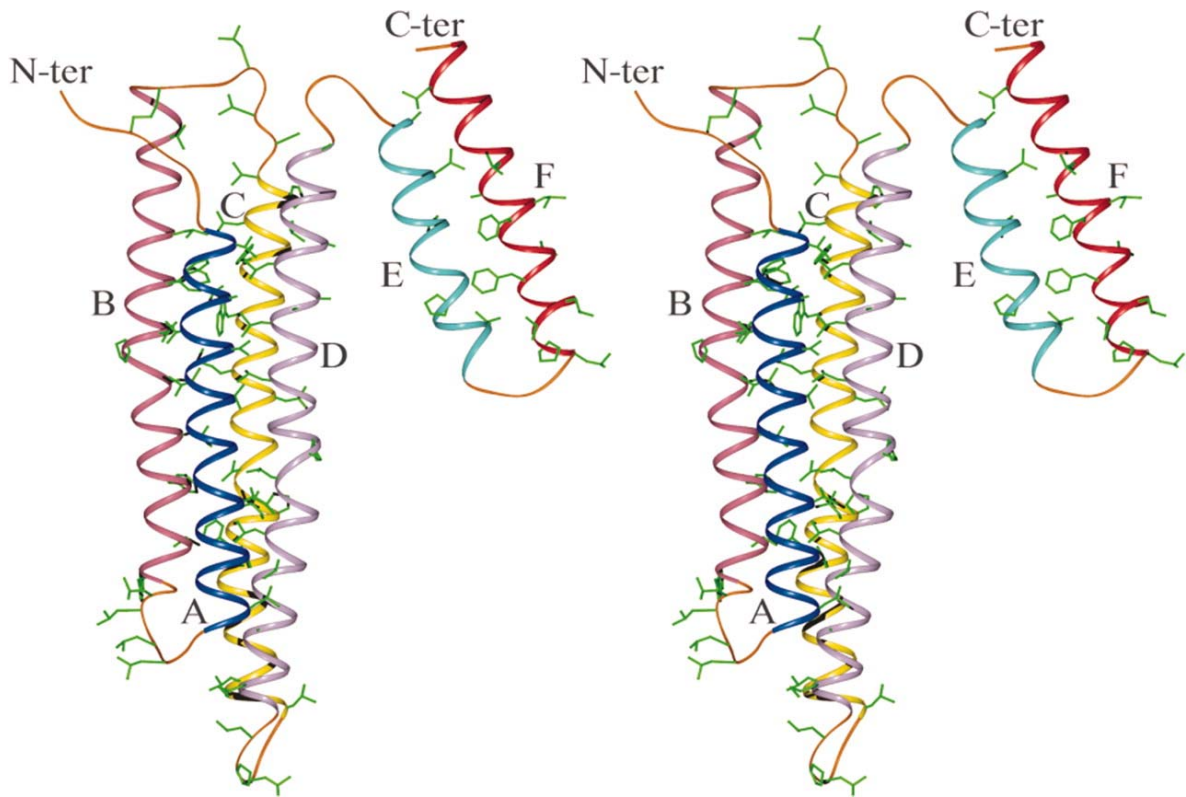


**Εικόνα 5.** Η δευτεροταγής δομή της apoA-I του ανθρώπου όπως προβλέφθηκε από την αλληλουχία των αμινοξέων της, αποτελείται από δέκα α-αμφιπαθικές έλικες που σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξέων που υποδεικνύονται (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999).



**Εικόνα 6.** Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των αμινοξέων στις διάφορες έλικες της apoA-I σύμφωνα με τον τροχό του Edmundson (Edmundson wheel). Όπου P: προλίνη, D: ασπαρτικό οξύ, E: γλουταμικό οξύ, R: αργινίνη, K: λυσίνη, F: φαινυλαλανίνη I: ισολευκίνη L: λευκίνη, M: μεθειονίνη, V: βαλίνη, W: τρυπτοφάνη, Y: τροσίνη, A: αλανίνη, C: κυστεΐνη, G: γλυκίνη, H: ιστιδίνη, N: ασπαραγίνη, Q: γλυταμίνη, S: σερίνη και T: θρεονίνη (Frank and Marcel 2000).

Υπό αυτές τις συνθήκες κρυστάλλωσης, η πρωτεΐνη σχηματίζει ένα δεμάτι τεσσάρων ελίκων στο αμινοτελικό άκρο της και δύο έλικες στο καρβοξυτελικό άκρο (**Εικόνα 7**). Η ανάλυση αυτή δείχνει ότι πρωτεΐνη αποΑ-I παρουσιάζει θετικά και αρνητικά φορτισμένες περιοχές στο μόριό της οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές για το βιολογικό της ρόλο. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε α-έλικες, 80% έναντι περίπου 58% που υπολογίζεται με φασματομετρία κυκλικού διχρωισμού (Gorshkova et al. 2006) και οι διαφορετικές διαστάσεις του μορίου της αποΑ-I (80x50x27 Å) που προβλέπονται από αυτή την ανάλυση, σε σχέση με προηγούμενες αναλύσεις (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999) μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες κρυστάλλωσης.



**Εικόνα 7.** Η κρυσταλλική δομή της apoA-I σε ανάλυση 2.4Å. Οι έξι έλικες της στερεοδομής απεικονίζονται με μπλε (A), ροζ (B), κίτρινο (C), μοβ (D), γαλάζιο (E), και κόκκινο (F). Οι θηλιές είναι με πορτοκαλί και με πράσινο τα υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων (Ajees et al. 2006)

## Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Α-I ΚΑΙ Η HDL

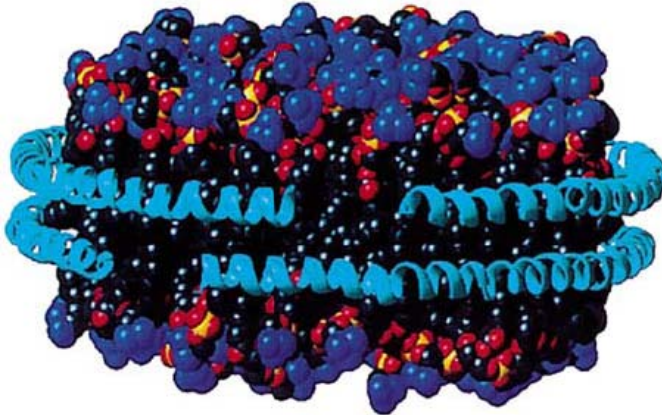
### Σχηματισμός δισκοειδών σωματιδίων

Η αποΑ-I εκκρίνεται από το ήπαρ και το έντερο ως φτωχή-λιπιδίων αποΑ-I (lipid-poor apoA-I). Με βάση τα διάφορα μοντέλα δομής της αποΑ-I και φυσικοχημικές μελέτες, έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για την οργάνωση των λιπιδίων και της αποΑ-I σε δισκοειδή και σφαιρικά σωματίδια.

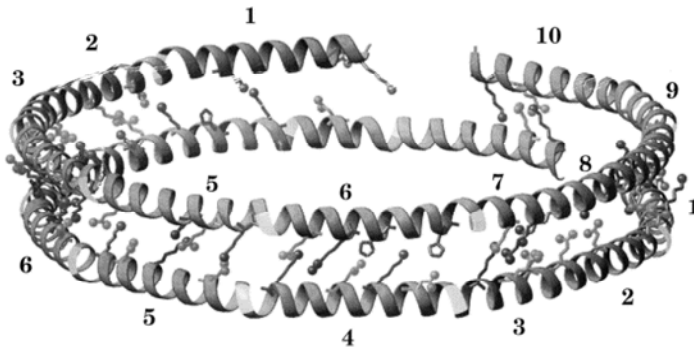
Στο λεγόμενο μοντέλο διπλής ζώνης (“double belt”), δύο μόρια αποΑ-I τυλίγονται σε αντιπαράλληλο προσανατολισμό γύρω από μια δισκοειδή διπλοστοιβάδα που αποτελείται από 160 μόρια λιπιδίων (**Εικόνα 8Α**). Έχει προταθεί ότι ο προσανατολισμός των δύο μορίων είναι τέτοιος που να μεγιστοποιεί τις αλληλεπιδράσεις δεσμών άλατος μέσα στο κάθε μόριο (Segrest et al. 1999) (**Εικόνα 8Β-Γ**). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι αμφιπαθικές α-έλικες έχουν κατά μέσο όρο 3.67 αμινοξικά κατάλοιπα (residues) ανά στροφή έλικας με την υδρόφοβη επιφάνεια να «βλέπει» εσωτερικά προς τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Μια τέτοια έλικα, ονομάζεται «11/3» και κάνει 3 πλήρης στροφές κάθε 11 αμινοξέα. Έχει προταθεί ότι ο μετασχηματισμός των δισκοειδών σωματιδίων σε σφαιρική HDL, που γίνεται μέσω της δράσης της LCAT, περιλαμβάνει την μετατροπή της 11/3 έλικας σε πραγματική α-έλικα με 3.6 αμινοξικά κατάλοιπα ανά στροφή (Segrest et al. 1999).

Το μοντέλο “looped belt” στο οποίο τα αμινοξέα 133-146 σχηματίζουν μια ευλύγιστη θηλειά, προσδίδει στην αποΑ-I την ικανότητα να προσαρμόζει την δομή της ώστε να εξυπηρετεί την μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα των σωματιδίων σε λιπίδια. Στο μοντέλο

A.



B.



Γ.

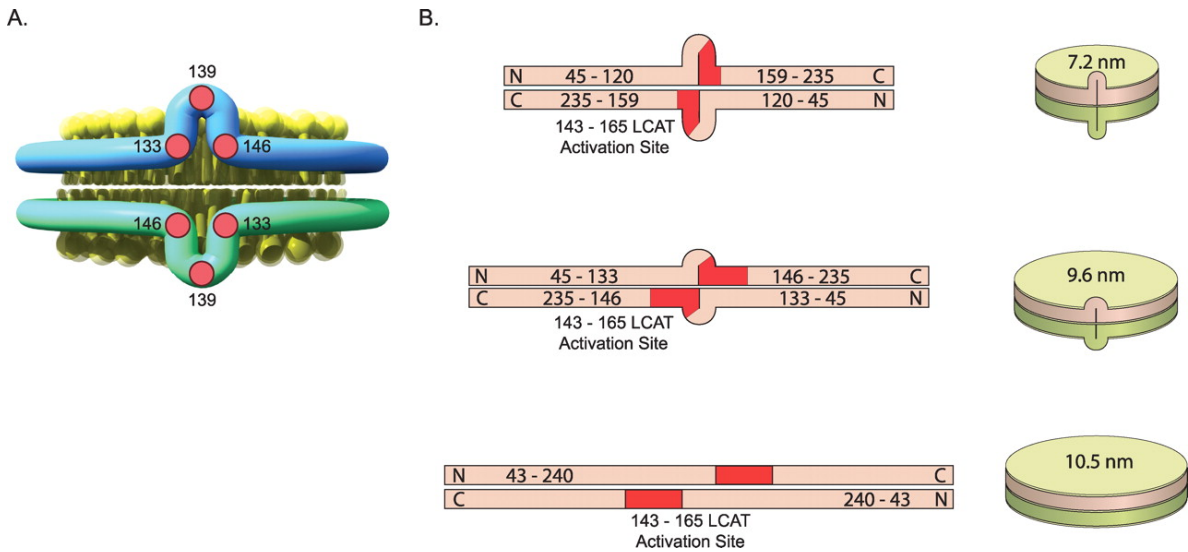
Ιοντικές  
αλληλεπιδράσεις μεταξύ  
των ελίκων δύο μορίων  
αποΑ-Ι, στο μοντέλο  
διπλής ζώνης της rHDL  
Έλικα Α Έλικα Β

70E	-----	K195
78E	-----	R188
89D	-----	R177
92E	-----	R173
96K	-----	E169
103D	-----	H162
111D	-----	H155
118K	-----	E147
125E	-----	K140
133K	--//--	K133
140K	-----	E125
147E	-----	K118
155H	-----	D111
162H	-----	D103
169E	-----	K96
173R	-----	K92
177R	-----	D89
188R	-----	E78
195K	-----	K70
235K	-----	K239
239K	-----	K235

**Εικόνα 8Α-Γ.** Το μοντέλο της διπλής ζώνης (double belt model) της δισκοειδούς HDL. Α. Δύο μόρια αποΑ-Ι-Δ(1-43) (έλικες σε γαλάζιο χρώμα) σε αντιπαράλληλη διάταξη γύρω από μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων διαμέτρου 85Å, Β. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών άλατος (salt bridges) που θεωρείται ότι σχηματίζονται μεταξύ των δύο μορίων αποΑ-Ι-Δ(1-43) (Segrest et al. 1999) και Γ. Λίστα των αμινοξέων των δύο ελίκων, Α και Β, που συμμετέχουν σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Τα αμινοξέα 133Κ αναπτύσσουν αποθητικές αλληλεπιδράσεις (Segrest et al. 1999)

αυτό το ένα μόριο αποΑ-I ευθυγραμμίζεται με το άλλο σε δομή έλικα 5- έλικα 5 (helix 5-helix 5 registry) που φέρει την έλικα 5 του ενός μορίου αποΑ-I απέναντι από την έλικα 5 του άλλου μορίου αποΑ-I (Martin et al. 2006) (**Εικόνα 9**).

Η δομή της αποΑ-I στα σφαιρικά σωματίδια της HDL δεν έχει αποσαφηνιστεί αλλά θεωρείται ότι είναι όμοια με αυτή που προτείνεται για τα δισκοειδή σωματίδια (Segrest et al. 2000; Davidson and Thompson 2007).



**Εικόνα 9.** Το μοντέλο «Looped belt» της apoA-I σε δισκοειδή rHDL. A, αποτελείται από μόρια της apoA-I σε αντιπαράλληλη διάταξη με μια κεντρική θηλιά στην θέση 139 με όρια τα κατάλοιπα 133 και 146. B, το μοντέλο αυτό προβλέπει ότι η κεντρική θηλιά είναι διαφορετικού μήκους σε rHDL διαφορετικών διαμέτρων (7.2, 9.4, και 10.5 nm), με την θηλιά να είναι μεγαλύτερη (στο δίσκο 7.2-nm) ή ανύπαρκτη (στο δίσκο 10.5-nm) σε σχέση με το δίσκο των 9.4-nm. Τα αμινοξέα που θεωρούνται σημαντικά για την ενεργοποίηση της LCAT (αμινοξέα 143-165) αντιπροσωπεύονται από την κόκκινη περιοχή. (Martin et al. 2006)



## **Προσθήκη λιπιδίων στην φτωχή-λιπιδίων αποΑ-I και σχηματισμός νεοσυντιθέμενης (nascent) HDL**

Η νεοσυντιθέμενη αποΑ-I αποκτά λιπίδια (φωσφολιπίδια και χοληστερόλη) για να σχηματίσει τα HDL σωματίδια. Η νεοσυντιθέμενη HDL που εκκρίνεται από το ήπαρ και το έντερο έχει  $\alpha$  ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η  $\alpha$ -HDL περιέχει γενικά 2 μόρια αποΑ-I ανά σωματίδιο και περίπου 10% της μάζας της είναι λιπίδια (ελεύθερη χοληστερόλη και φωσφολιπίδια) (Kunitake et al. 1985). Παρόμοια σωματίδια σχηματίζονται κατά τον καταβολισμό ώριμης HDL (Hennessy et al. 1993). Τα  $\alpha$  σωματίδια αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των σωματιδίων του πλάσματος και πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο ως αποδέκτες ελεύθερης χοληστερόλης από τα κύτταρα (Fielding and Fielding 1995). Μονομοριακή αποΑ-I φτωχή σε λιπίδια ή ελεύθερη λιπιδίων μεταναστεύει με την ίδια κινητικότητα και επάγει την έξοδο χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα μέσω του ABCA1. Η αποΑ-I φτωχή λιπιδίων ή ελεύθερη λιπιδίων δεν ανιχνεύεται *in vivo* υπό φυσιολογικές συνθήκες μιας και ή αποκτά λιπίδια και σχηματίζει  $\alpha$ -HDL ή ενσωματώνεται σε ώριμη HDL, ή τέλος, καταβολίζεται και χάνεται μέσω των νεφρών (Kozyraki et al. 1999).

Η έξοδος χοληστερόλης από τα κύτταρα μπορεί να συμβεί με διάφορους μηχανισμούς όπως ελεγχόμενη έξοδο μέσω μεταφορέων ή με απλή διάχυση (Yancey et al. 2003). Ο ABCA1 επάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα, κατά προτίμηση σε αποΑ-I φτωχή-λιπιδίων (Chroni et al. 2003). Ο σημαντικός ρόλος του ABCA1 στα επίπεδα HDL-χοληστερόλης στο πλάσμα θεωρείται δεδομένος και περιγράφεται παρακάτω.

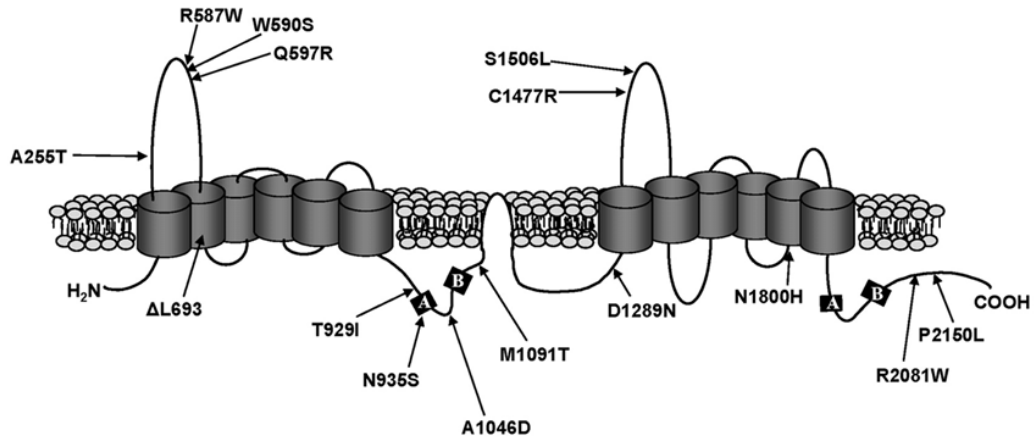
## **Ο ΜΕΤΑΦΟΡΕΑΣ ABCA1**

Ο ABCA1 είναι μέλος της οικογένειας των ABC (ATP binding cassette) μεταφορέων. Είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους ~200 kDa και περιέχει 12 διαμεμβρανικές έλικες, δύο κυτταροπλασματικές περιοχές που δεσμεύουν ATP, και δύο μεγάλες εξωκυττάριας θηλειές (Oram 2003; Luciani et al. 1994; Fitzgerald et al. 2002) (**Εικόνα 10**). Είναι μια ευρέως εκφραζόμενη πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε αφθονία στο ήπαρ, τα μακροφάγα, τον εγκέφαλο και σε πολλούς άλλους ιστούς (Langmann et al. 1999; Kielar et al. 2001).

Ο ABCA1 δρά στην βασική επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, σχετίζεται με ενδοκυτταρικά κυστίδια και μετακινείται μεταξύ ώριμων ενδοκυτταρικών κυστιδίων και της επιφάνειας του κυττάρου (Neufeld et al. 2002).

Ο ABCA1 επάγει την έξοδο χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από το κύτταρο σε ελεύθερη αποA-I και άλλες απολιποπρωτεΐνες αλλά όχι σε σφαιρικά HDL σωματίδια (Oram and Vaughan 2000; Wang et al. 2000; Remaley et al. 2001). Έλλειψη του ABCA1 αποτελεί την γενετική βάση της ασθένειας Tangier (Rust et al. 1999; Bodzioch et al. 1999; Brooks-Wilson et al. 1999) η οποία σχετίζεται με πολύ χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης και αποA-I στο πλάσμα. Επίμυες με έλλειψη ABCA1 έχουν παρόμοιο φαινότυπο με αυτόν των ασθενών με ασθένεια Tangier (McNeish et al. 2000). Ασθενείς με ασθένεια Tangier και επίμυες με έλλειψη ABCA1 (ABCA1<sup>-/-</sup>) δεν σχηματίζουν δισκοειδή ή σφαιρικά σωματίδια HDL και εμφανίζουν ανώμαλη συσσώρευση λιπιδίων σε διάφορους ιστούς (Orso et al. 2000; McNeish et al. 2000; Christiansen-Weber et al. 2000).

Η έξοδος χοληστερόλης από επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπων με νόσο Tangier, που παρουσιάζουν λειτουργικές ανωμαλίες στον ABCA1, είναι μειωμένη και αυτό επηρεάζει



**Εικόνα 10.** Σχηματική απεικόνιση της δομής του μεταφορέα ABCA1 στην κυτταρική μεμβράνη. Δικρίνονται οι διαμεμβρανικές περιοχές (σε μορφή κυλίνδρου) και οι κυτταροπλασματικές και εξωκυττάρειες θηλιές της πρωτεΐνης, ενώ με A και B σημειώνονται οι περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων. Με βέλη σημειώνονται 15 μεταλλάξεις αντικατάστασης αμινοξέων (missense mutations) που έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με «Tangier disease» και οικογενή υπο-άλφα-λιποπρωτεϊναιμία (familial hypoalphalipoproteinemia) (Singaraja et al. 2006b).

ανάλογα την συγκέντρωση της HDL-χοληστερόλης στο πλάσμα των ασθενών (Marcil et al. 1999; Brooks-Wilson et al. 1999; Clee et al. 2000). Πρόσφατες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η λιπιδίωση των απολιποπρωτεϊνών της HDL γίνεται μετά την έκκρισή τους και ότι ο ABCA-1 είναι απαραίτητος για την πρώιμη λιπιδίωση της apoA-I (Chroni et al. 2003).

Η παραγωγή της apoA-I κατά την ασθένεια Tangier είναι φυσιολογική αλλά η πρωτεΐνη καταβολίζεται πολύ γρήγορα (Schaefer et al. 1978). Υπολογίζεται ότι μεταλλάξεις στον ABCA1 ευθύνονται για τουλάχιστο το 10% των ατόμων του γενικού πληθυσμού με χαμηλά επίπεδα HDL (Cohen et al. 2004; Frikke-Schmidt et al. 2004).

Αν και εκφράζεται ευρέως, ο ABCA1 στο ήπαρ και το έντερο φαίνεται να είναι υπεύθυνος, κατά μεγάλη πλειονότητα, για την λιπιδίωση της apoA-I. Επίμυες με έλλειψη ABCA1<sup>-/-</sup> συγκεκριμένα στο ήπαρ έχουν επίπεδα HDL χοληστερόλης μειωμένα κατά 80% (Timmins et al. 2005), και επίμυες με έλλειψη του ABCA1 στο έντερο έχουν 30% μείωση της HDL χοληστερόλης (Brunham et al. 2006). Υπερέκφραση του ABCA1 στο ήπαρ αύξησε τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης (Basso et al. 2003; Wellington et al. 2003) και συσχετίστηκε με προστασία κατά της αθηροσκλήρωσης (Vaisman et al. 2001; Singaraja et al. 2002; Attie et al. 2001). Έλλειψη του ABCA1 σε LDLr<sup>-/-</sup> (με έλλειψη του LDL υποδοχέα) ή apoE<sup>-/-</sup> (με έλλειψη της apoE) επίμυες προκάλεσε οξεία ξανθωμάτωση (xanthomatosis) αλλά δεν επηρέασε το βαθμό αθηροσκλήρωσης στα ποντίκια αυτά. Όμως, μεταμόσχευση μυελού των οστών που προκάλεσε επιλεκτική απενεργοποίηση του ABCA1 μόνο στα μακροφάγα και τα λευκοκύτταρα αύξησε την αθηροσκλήρωση και στα δύο μοντέλα ποντικών (Aiello et al. 2002) (Van Eck et al. 2002). Τα πειράματα αυτά καθώς και τελευταία δεδομένα από πειράματα μεταφοράς

μυελού των οστών από ABCA1<sup>-/-</sup> επίμυες, φανερώνουν ότι η έκφραση του ABCA1 στα μακροφάγα είναι σημαντική για την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης προς το ήπαρ και κατά συνέπεια για την προστασία από την αθηροσκλήρωση (Wang et al. 2007).

Φαίνεται, επίσης, ότι η έκφραση του ABCA1 στα λευκοκύτταρα προστατεύει από αθηροσκλήρωση και ελέγχει την στρατολόγηση των μακροφάγων (Van Eck et al. 2002). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο ABCA1 μεσολαβεί στη μεταφορά λιπιδίων των ώριμων (late) ενδοκυτταρικών κυστιδίων που σχετίζονται με την πρωτεΐνη Niemann-Pick C1 στην αποΑ-I που εισέρχεται στα ενδοσώματα μαζί με τον ABCA1. Το σύμπλοκο αποΑ-I/ABCA1 επιστρέφει στην επιφάνεια του κυττάρου και το σύμπλοκο απελευθερώνει νεοσυντιθέμενη HDL (Neufeld et al. 2004).

Είναι ενδιαφέρον ότι έλλειψη του ABCA1 επιλεκτικά στα μακροφάγα έχει μικρή επίδραση στην μείωση των επιπέδων HDL χοληστερόλης στο πλάσμα ποντικών, αλλά προκαλεί σημαντική αύξηση στα επίπεδα αθηροσκλήρωσης (Aiello et al. 2002), μέσω της μειωμένης αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης από τα μακροφάγα στο ήπαρ. Φαίνεται, δηλαδή, ότι ο ABCA1 στα μακροφάγα συμβάλλει λίγο στα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης στο πλάσμα (Haghpasand et al. 2001), αλλά είναι σημαντικός για την προστασία κατά της αθηροσκλήρωσης. Υποστηρίζεται ότι υπάρχουν διακριτοί και συγκεκριμένοι ρόλοι τόσο του ηπατικού όσο και του εκτός-ήπατος ABCA1 στην βιογένεση της HDL *in vivo* και υποστηρίζεται ότι ο ABCA1 χαρακτηρίζεται από επιλεκτικότητα μεταφοράς λιπιδίων σε σωματίδια λιποπρωτεϊνών ανάλογα με την περιοχή έκφρασής του (Singaraja et al. 2006a)

Ο ABCA1 φαίνεται ακόμα να μεσολαβεί στην έκκριση του συνδέτη του, της αποΕ, από τα μακροφάγα, η οποία μπορεί να δράσει ως αποδέκτης χοληστερόλης και να επάγει ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης (von Eckardstein et al. 2001).

Το καρβοξυτελικό μοτίβο 2215-VFVNFA-2220 του ABCA1 είναι σημαντικό για την πρόσδεση του αποδέκτη χοληστερόλης αποΑ-I και για την έξοδο χοληστερόλης (Fitzgerald et al. 2004b). Τα αμινοξικά κατάλοιπα SYV στο καρβοξυτελικό κομμάτι του ABCA1 αλληλεπιδρούν με την PDZ πρωτεΐνη  $\alpha$ 1-syntrophin. Υπερέκφραση της  $\alpha$ 1-syntrophin σε κυτταρικές καλλιέργειες αυξάνουν την έξοδο χοληστερόλης μέσω του ABCA1 (Munehira et al. 2004). Έχει προταθεί ότι το σύμπλοκο ABCA1/ $\beta$ 2-syntrophin/utrophin εξυπηρετεί στην συγκράτηση του ABCA1 στα ενδοκυτταρικά κυστίδια (Buechler et al. 2002).

### **Σταθερότητα του ABCA1**

Η σταθερότητα του ABCA1 ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης. Η πρόσδεση αποΑ-I, αποΕ, αποΑ-II και αμφιπαθικών πεπτιδίων μειώνει την αποικοδόμηση του ABCA1 μέσω της calpain, επάγει την φωσφορυλίωσή του μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C, και επάγει την έξοδο λιπιδίων (Yamauchi et al. 2003; Arakawa et al. 2004). Ο ABCA1 φωσφορυλιώνεται στις θέσεις Thr-1242, Thr-1243 και Ser-1255 από την πρωτεϊνική κινάση CK2, και αναστολή των φωσφορυλίσεων αυτών μειώνει την πρόσδεση με την αποΑ-I και την αποΑ-II καθώς και την έξοδο λιπιδίων (Roosbeek et al. 2004).

Ο ABCA1 περιέχει μια αλληλουχία PEST η οποία είναι κοινή αλληλουχία σε πρωτεΐνες που εμφανίζουν γρήγορο κύκλο ανακύκλωσης (turnover) και χαρακτηρίζεται από την παρουσία προλίνης, γλουταμικού οξέος, σερίνης και θρεονίνης (Wang et al.

2003). Πρόσφατα ο Tall και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι φωσφορυλίωση στις Thr-1286 και Thr-1305, που ανήκουν στην PEST αλληλουχία του ABCA1, επάγει την αποικοδόμησή του μέσω της calpain, σε διαφοροποιημένα κύτταρα THP-1, ενώ πρόσδεση της apoA-I στον ABCA1 επάγει την αποφωσφορυλίωση των θέσεων αυτών και αποτρέπει την αποικοδόμησή του (Martinez et al. 2003). Η αποικοδόμηση του ABCA1 μέσω του πρωτεασώματος της ομπικουϊτίνης ενεργοποιείται από περίσσεια ελεύθερης χοληστερόλης (Feng and Tabas 2002) και ακόρεστων λιπαρών οξέων (Wang and Oram 2002).

### **Ρύθμιση της έκφρασης του ABCA1**

Οι σημαντικές λειτουργίες του ABCA1 που οδηγούν στη βιογένεση της HDL και ο αθηροπροστατευτικός του ρόλος, οδήγησε σε μελέτες ρύθμισης της έκφρασης του ABCA1 με απώτερο στόχο την ανάπτυξη νέων θεραπειών. Οι LXRα και LXRβ είναι πυρηνικοί υποδοχείς που ανιχνεύουν την περίσσεια κυτταρικής χοληστερόλης και φυσιολογικοί συνδέτες τους είναι οι οξυστερόλες (Tontonoz and Mangelsdorf 2003; Lund et al. 2003). Συνθετικοί αγωνιστές του LXR επάγουν την έκφραση του ABCA1 στα μακροφάγα, αυξάνουν την έξοδο χοληστερόλης *in vitro*, και μειώνουν την αθηροσκλήρωση στα ποντίκια (Joseph et al. 2002; Levin et al. 2005). Η αύξηση του LXR, όμως, οδηγεί στην ανάπτυξη υπερτριγλυκεριδαιμίας και λιπαρού ήπατος, εν μέρη λόγω της LXR-εξαρτώμενης αύξησης του ηπατικού SREBP-1c (Schultz et al. 2000).

Φαίνεται ότι αγωνιστές ειδικοί για τον LXRβ πιθανόν στο μέλλον να πετύχουν αύξηση της HDL-χοληστερόλη και να επάγουν την έξοδο χοληστερόλης από τα μακροφάγα χωρίς να προκαλούν συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο συκώτι (Lund et al.

2006). Επίσης, συνθετικοί αγωνιστές των PPAR $\alpha$  (peroxisome-proliferator-activated receptor) και PPAR $\gamma$  επάγουν την έκφραση των LXR και ABCA1 και οδηγούν έξοδο χοληστερόλης *in vitro* (Chinetti et al. 2001).

### **Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις του ABCA1 με την αποΑ-I**

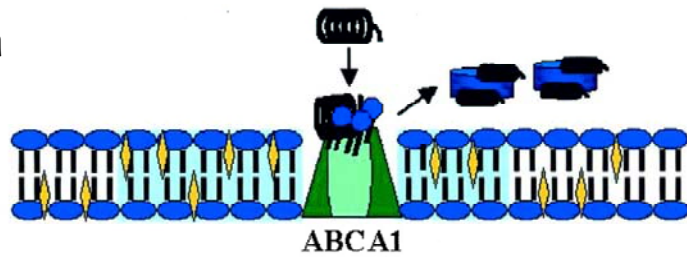
Σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον υπάρχει γύρω από το μηχανισμό λιπιδίωσης της αποΑ-I που αποτελεί το αρχικό βήμα στην βιογένεση της HDL. Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για την αλληλεπίδραση της αποΑ-I με τον μεταφορέα ABCA1 η οποία οδηγεί σε έξοδο χοληστερόλης:

### **Μοντέλο έμμεσης αλληλεπίδρασης**

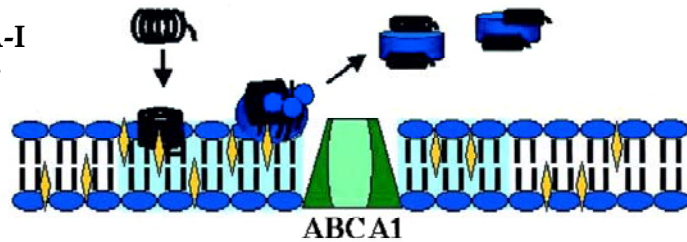
Το πρώτο μοντέλο υποστηρίζει ότι δεν υπάρχει άμεση σύνδεση του ABCA1 και της αποΑ-I. Αντί αυτού, προτείνει τον σχηματισμό ασταθών περιοχών στη μεμβράνη μέσω μετατόπισης φωσφολιπιδίων, ειδικά φωσφατιδυλοσερίνης, στο εξωκυτταρικό τμήμα της πλασματικής μεμβράνης μέσω της δράσης του ABCA1. Η μετατόπιση αυτή μπορεί να βοηθήσει στην συγκράτηση της αποΑ-I στις περιοχές αυτές και ακολούθως στην λιπιδίωση των αμφιπαθικών ελίκων της αποΑ-I (Chambenoit et al. 2001; Rigot et al. 2002). Στο ίδιο μοντέλο βασίζεται και η ιδέα ότι η λιπιδίωση της αποΑ-I, μετά την συγκράτηση της αποΑ-I στην μεμβράνη, συμβάλλει στην έξοδο φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης μέσω μικροδιαλυτοποίησης (microsolubilization) (Vaughan and Oram 2003) (**Εικόνα 11**).



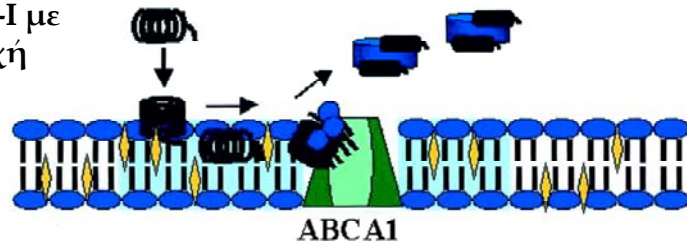
Άμεση Αλληλεπίδραση  
αποΑ-I / ABCA1



Αλληλεπίδραση αποΑ-I  
με περιοχή λιπιδίων



Αλληλεπίδραση αποΑ-I με  
ABCA1 και με περιοχή  
λιπιδίων



 = Φωσφολιπίδια     
  = αποΑ-I     
  = Χοληστερόλη

**Εικόνα 11.** Σχηματική απεικόνιση των μοντέλων που έχουν προταθεί για την ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης από την μεμβράνη των κυττάρων στην αποΑ-I (Yancey et al. 2003).

## **Το υβριδικό μοντέλο πρόσδεσης-αλληλεπίδρασης και το μοντέλο δύο θέσεων πρόσδεσης.**

Το δεύτερο μοντέλο, γνωστό ως υβριδικό μοντέλο, είναι μια παραλλαγή του πρώτου. Στο μοντέλο αυτό, η αρχική πρόσδεση της αποΑ-I στην μεμβράνη επιτυγχάνεται μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της αποΑ-I και στη συνέχεια η προσδεμένη στην μεμβράνη αποΑ-I αλληλεπιδρά με τον ABCA1 ο οποίος της μεταφέρει λιπίδια (Panagotopoulos et al. 2002) (Εικόνα 11).

Η ιδέα του υβριδικού μοντέλου φαίνεται να εξελίσσεται με το μόλις πρόσφατα (Μάιος 2007) προταθέν από τους Phillips et al. μοντέλο δύο θέσεων αλληλεπίδρασης της αποΑ-I, με τα κύτταρα, για την έξοδο λιπιδίων. Στην μελέτη αυτή, οι ερευνητές προσπάθησαν να χαρακτηρίσουν τις θέσεις πρόσδεσης της αποΑ-I στα κύτταρα. Υποστηρίζεται ότι, ο μεταφορέας ABCA1 δημιουργεί δύο ξεχωριστές θέσεις αλληλεπίδρασης του κυττάρου με την αποΑ-I. Η πρώτη είναι χαμηλής απόδοσης και αφορά άμεση αλληλεπίδραση της αποΑ-I με τον ABCA1, ενώ η δεύτερη θέση είναι υψηλής απόδοσης και αφορά αλληλεπίδραση της αποΑ-I με λιπίδια οργανωμένα στην κυτταρική μεμβράνη από την δράση του ABCA1 (Vedhachalam et al. 2007).

### **Μοντέλο άμεσης αλληλεπίδρασης**

Το τρίτο μοντέλο υποστηρίζει την άμεση φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ αποΑ-I και ABCA1 (Wang et al. 2000; Fitzgerald et al. 2002) ακολουθούμενη από μεταφορά λιπιδίων μέσω του ABCA1. Το πρώτο βήμα είναι ο σχηματισμός ενός ισχυρού συμπλόκου μεταξύ του ABCA1 και των συνδετών του. Η πρόσδεση αποΑ-I/ABCA1 που έχει χρόνο ημιζωής 30 λεπτών (Fitzgerald et al. 2004a) φαίνεται να είναι ένα απαραίτητο

αλλά όχι και ικανό βήμα για την έξοδο λιπιδίων. Το δεύτερο βήμα είναι η μεταφορά λιπιδίων από το κύτταρο στην αποΑ-I (λιπιδίωση). Αυτό φαίνεται να απαιτεί το σχηματισμό ενός λειτουργικού συμπλόκου μεταξύ της αποΑ-I και του ABCA1 (Zannis et al. 2006).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν με ότι ελλειμματικές μορφές της αποΑ-I στις οποίες λείπει η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 220 έως 231 μειώνουν την ικανότητα της αποΑ-I για ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης, ενώ ελλειμματικές μορφές του καρβοξυτελικού άκρου οι οποίες διατηρούν την περιοχή 220-231, δεν επηρεάζουν την ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης, *in vitro* (Chroni et al. 2003). Μελέτες χρησιμοποιώντας χημική διασύνδεση (cross-linking) ακολουθούμενη από ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation) έδειξαν ότι η ικανότητα μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I να επάγουν έξοδο χοληστερόλης μέσω του ABCA1 συσχετίζεται με την ικανότητα των μεταλλαγμάτων αυτών να συνδέονται αποτελεσματικά (μέσω cross-linking) με τον ABCA1 (Chroni et al. 2004b). Εκτός της αποΑ-I, και άλλες απολιποπρωτεΐνες λειτουργούν ως αποδέκτες χοληστερόλης από τον ABCA1 (Remaley et al. 2001). Το κοινό στοιχείο των μορίων αυτών είναι ότι περιέχουν αμφιπαθικές α-έλικες. Δεν φαίνεται να υπάρχει αυστηρή απαίτηση για συγκεκριμένη τεταρτοταγή δομή των μορίων για την επαγωγή εξόδου χοληστερόλης μέσω του ABCA1 (Chroni et al. 2004b). Έχει δειχθεί ότι η άμεση αλληλεπίδραση και πρόσδεση της αποΑ-I στον ABCA1 ακόμα και όταν είναι ισχυρή, όπως ισχύει για την μετάλλαξη Trp590Ser του ABCA1 (Fitzgerald et al. 2002) παρουσιάζει μειωμένη έξοδο χοληστερόλης (Chroni et al. 2004b). Έτσι, φαίνεται ότι η πρόσδεση αποΑ-I/ABCA1 δεν είναι ικανή από μόνη της να επάγει αποτελεσματικά έξοδο χοληστερόλης.

## **Αναδιοργάνωση της HDL από τους ABCG1 και ABCG4**

Οι ABCG1 και ABCG4 είναι δύο ακόμα μέλη της οικογένειας των ABC μεταφορέων που δρουν ως διμερή (half transporters) με μοριακό μέγεθος περίπου 67 kDa (Oldfield et al. 2002; Klucken et al. 2000).

Ο ABCG1 εκφράζεται στον σπλήνα, τον θύμο-αδένα, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο (Savary et al. 1996; Croop et al. 1997; Nakamura et al. 2004) και επάγεται από αγωνιστές του LXR ή από συσσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα και στο ήπαρ (Klucken et al. 2000; Venkateswaran et al. 2000; Tangirala et al. 2002). Η έκφραση του ABCG4 περιορίζεται στους οφθαλμούς και τον εγκέφαλο (Oldfield et al. 2002).

Οι μεταφορείς ABCG1 και ABCG4 φαίνεται να προάγουν στην έξοδο χοληστερόλης από τα μακροφάγα σε ώριμα σωματίδια HDL αλλά όχι σε φτωχή-λιπιδίων αποΑ-I (Wang et al. 2004; Vaughan and Oram 2005; Nakamura et al. 2004).

Έχει αναφερθεί ότι η έξοδος χοληστερόλης δεν απαιτεί την άμεση πρόσδεση του αποδέκτη στους ABCG1 ή ABCG4. Οι ερευνητές υποθέτουν ότι η έκφραση του ABCG1 μεταβάλλει την κατανομή της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη και επιτρέπει την απομάκρυνσή της από την HDL (Vaughan and Oram 2005).

Επίμυες με έλλειψη του ABCG1 παρουσιάζουν σημαντική συσσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα, ενώ υπερέκφραση του ABCG1 προστατεύει τους ιστούς από συσσώρευση χοληστερόλης (Kennedy et al. 2005). Φαίνεται γενικά ότι οι ABCG1 και ABCG4 μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο την ομοιόσταση των λιπιδίων στον εγκέφαλο και την κυκλοφορία και να συμβάλλουν στην αναδιοργάνωση (remodeling) της HDL.

### **O SR-BI (SCAVENGER RECEPTOR CLASS B, TYPE I)**

Ο SR-BI είναι μια ακόμα πρωτεΐνη που μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην έξοδο χοληστερόλης στην ώριμη HDL (Rothblat et al. 1999). Η επίδραση της εξόδου χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω του SR-BI στον μεταβολισμό της HDL και στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Επίμυες με έλλειψη SR-BI έχουν αυξημένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης (Rigotti et al. 1997; Yesilaltay et al. 2006). Τα ποντίκια αυτά όμως εμφανίζουν και αυξημένη αθηροσκλήρωση (Trigatti et al. 2004) η οποία μπορεί, εν μέρει, να οφείλεται στην μειωμένη έξοδο χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Πράγματι, επίμυες με έλλειψη SR-BI συγκεκριμένα και μόνο στα μακροφάγα τους, έχουν φυσιολογικά επίπεδα HDL-χοληστερόλης αλλά παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα αθηροσκλήρωσης (Van Eck et al. 2004).

## ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ HDL

Ενώ το ήπαρ και το έντερο είναι σημαντικά για την πρόιμη λιπιδίωση της αποΑ-I μέσω του ABCA1, η HDL αποκτά την μεγαλύτερη μάζα των λιπιδίων της από άλλες πηγές. Πιθανές πηγές είναι άλλοι ιστοί και άλλες λιποπρωτεΐνες. Στα ποντίκια περίπου 90 mg χοληστερόλης ανά kg σωματικού βάρους, την ημέρα, μεταφέρονται από μη ηπατικούς ιστούς στην HDL (Dietschy and Turley 2002). Λίγα είναι γνωστά για τις πηγές και τους μηχανισμούς της λιπιδίωσης της HDL από τους περιφερικούς ιστούς. Από την άποψη της αθηροσκλήρωσης, τα μακροφάγα είναι ο σημαντικότερος τύπος κυττάρων που προσφέρουν χοληστερόλη αλλά η συμβολή τους είναι μικρή στην συνολική HDL. Αυτό έγινε φανερό από πειράματα μεταφοράς αγρίου τύπου (WT) μυελού των οστών σε ABCA1<sup>-/-</sup> επίμυες. Τα πειράματα έδειξαν μικρή αλλά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης που προήλθε από την έκφραση του ABCA1 στα μακροφάγα και άλλα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (Haghpasand et al. 2001). Άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν αποΑ-I<sup>-/-</sup> επίμυες στους οποίους μετέφεραν μυελό των οστών από διαγονιδιακούς επίμυες που εκφράζουν ανθρώπινη αποΑ-I στα μακροφάγα τους. Τα πειράματα έδειξαν ότι η έκφραση της αποΑ-I δεν επηρέασε τα επίπεδα HDL-χοληστερόλης στο πλάσμα αλλά μείωσε την αθηροσκλήρωση στα πειραματόζωα (Major et al. 2001). Τα περιφερικά όργανα και ιστοί χρειάζονται χοληστερόλη αλλά δεν την μεταβολίζουν, οπότε είναι αναγκαία η έξοδος της περίσσειας χοληστερόλης μέσω του ABCA1, SR-BI, ABCG1 ή άλλων μηχανισμών στην HDL.

Δεν είναι, επίσης, γνωστό κατά πόσο άλλοι ιστοί όπως σκελετικοί μύες, ο λιπώδης ιστός και το δέρμα συμβάλλουν ο καθένας στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Έχει δειχθεί ότι κύτταρα από τους ιστούς αυτούς συμβάλλουν στην έξοδο χοληστερόλης στην

αποΑ-I και την HDL, *in vitro*. Η HDL, επίσης, αποκτά λιπίδια, κυρίως φωσφολιπίδια, από άλλες λιποπρωτεΐνες. Όταν οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες υφίστανται υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τους, τότε φωσφολιπίδια μεταφέρονται στην HDL μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς των φωσφολιπιδίων (PLTP) (Huuskonen et al. 2001).

### **Μετασηματισμός δισκοειδούς HDL σε σφαιρική από το ένζυμο LCAT**

Το ένζυμο LCAT (lecithin : cholesterol acyl- transferase: ακυλ- τρανσφεράση λεκιθίνης : χοληστερόλης) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 416-αμινοξέων που εκκρίνεται από το ήπαρ στον άνθρωπο και κυκλοφορεί στο αίμα δεσμευμένη σε λιποπρωτεΐνες ή σε ελεύθερη μορφή (McLean et al. 1986b; McLean et al. 1986a). Η LCAT αλληλεπιδρά με την μη εστεροποιημένη χοληστερόλη σε δισκοειδή και σφαιρικά σωματίδια HDL, μεταφέροντας την 2-ακυλομάδα της λεκιθίνης ή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης στο ελεύθερο υδροξύλιο της χοληστερόλης σχηματίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο εστέρες χοληστερόλης που μεταφέρονται και συγκρατούνται στον πυρήνα της HDL (Fielding et al. 1972; Gordon and Rifkind 1989) (**Εικόνα 2**). Η LCAT δρα και εστεροποιεί την χοληστερόλη και στα LDL σωματίδια (Santamarina-Fojo et al. 2001).

### **Αλληλεπιδράσεις της αποΑ-I και της LCAT**

Η αποΑ-I της HDL είναι ο κύριος φυσιολογικός ενεργοποιητής (co-factor) του ενζύμου LCAT (Fielding et al. 1972). Μεταλλάξεις της LCAT σχετίζονται είτε με την κλασική έλλειψη του ενζύμου που χαρακτηρίζεται από έλλειψη εστεροποίησης της χοληστερόλης ή με την ασθένεια «fish-eye disease» που χαρακτηρίζεται από ανικανότητα του ενζύμου να εστεροποιήσει την χοληστερόλη της HDL αλλά όχι και της LDL (Funke et al. 1991).

Στην περίπτωση έλλειψης της LCAT υπάρχει συσσώρευση δισκοειδών HDL σωματιδίων στο πλάσμα (Santamarina-Fojo et al. 2001), ενώ η “fish-eye disease” παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Σουηδία και χαρακτηρίζεται από θολερότητα του ματιού των ασθενών (Carlson and Philipson 1979).

Μελέτες σε ανθρώπους και σε μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι δισκοειδή σωματίδια μπορεί να συσσωρεύονται στο πλάσμα σε περιπτώσεις μεταλλάξεων στην apoA-I (Reardon et al. 2001; Chroni et al. 2003; McManus et al. 2000; Scott et al. 2001; Chroni et al. 2005b; Chroni et al. 2005a). Μελέτες μεταφοράς μέσω αδενοϊών γονιδίων που φέρουν μεταλλάξεις της apoA-I σε επίμυες με έλλειψη της apoA-I (apoA-I<sup>-/-</sup>), έδειξαν ότι αντικατάσταση των υδρόφοβων αμινοξέων στην περιοχή 211 έως 229 της apoA-I είτε από φορτισμένα ή από μικρότερα υδρόφοβα αμινοξέα οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης και στο σχηματισμό δισκοειδών HDL σωματιδίων. Σε αντίθεση, αντικατάσταση των φορτισμένων αμινοξέων στην περιοχή 234 έως 239 από αλανίνη (Ala) οδήγησε στο σχηματισμό φυσιολογικής HDL (Reardon et al. 2001). Αυτό δηλώνει ότι τα υδρόφοβα αμινοξέα της καρβοξυτελικής περιοχής της apoA-I παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT *in vivo*. Σχηματισμό δισκοειδών σωματιδίων HDL παρατηρήθηκε επίσης και στην περίπτωση δύο σημειακών μεταλλάξεων σε αμινοξέα της έλικας 6 της apoA-I (apoA-I[Arg160Val/His162Ala]) (Chroni et al. 2005a). Οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις εκμηδένισαν την ικανότητα της apoA-I να ενεργοποιεί την LCAT *in vitro* (Chroni et al. 2005a). Μετά από γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών των μεταλλάξεων αυτών σε apoA-I<sup>-/-</sup> ποντίκια, τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης εμφάνισαν δραματική μείωση, ενώ η χοληστερόλη και η apoA-I του πλάσματος κατανέμονταν στην περιοχή της HDL3. Αναλύσεις ηλεκτρονικού



μικροσκοπίου και ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων έδειξε ότι η apoA-I(Arg160Val/His162Ala) σχημάτισε κυρίως δισκοειδή σωματίδια HDL, ενώ ήταν αυξημένη η αναλογία preβ1-HDL/α-HDL. Συνδυασμένη μόλυνση ποντικών με αδενοϊούς που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Arg160Val/His162Ala) και την LCAT του ανθρώπου, αύξησε δραματικά τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης και της apoA-I, επέτρεψε το σχηματισμό σφαιρικών HDL σωματιδίων, και επανέφερε το λόγο preβ1-HDL/α-HDL σε φυσιολογικά επίπεδα, φανερώνοντας ότι η δράση της LCAT ήταν ο περιοριστικός παράγων για την μετατροπή των δισκοειδών σωματιδίων σε σφαιρική HDL.

## **ΑΝΤΙ-ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ HDL.**

### **Αθηροματωγόνος HDL (ή αλλιώς η «κακή» καλή-χοληστερόλη)**

Εκτός του ρόλου της στην θεωρούμενη αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, η HDL φαίνεται να παίζει και ρόλο ρυθμιστή σε συνθήκες φλεγμονής. Είναι γνωστό ότι η οξειδωμένη χοληστερόλη και τα προϊόντα της είναι σημαντικά για την οξείδωση της LDL, η οποία προκαλεί βλάβες στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει προταθεί ότι η HDL εμποδίζει την οξείδωση της LDL που προκαλεί κυτταροτοξικότητα (Hessler et al. 1979). Η οξείδωση των φωσφολιπιδίων της LDL σχηματίζει μια σειρά οξειδωμένων λιπιδίων που μπορούν να οδηγήσουν στην αθηρογένεση (Berliner and Watson 2005). Τα αφρώδη κύτταρα (foam cells) είναι από τα κύρια χαρακτηριστικά των ασταθών αθηρωματικών πλακών που είναι επικίνδυνες να «σπάσουν» και να προκαλέσουν θρόμβωση. Σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση χοληστερόλης από την LDL έχουν τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος, ενώ σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα παίζει η apoA-I και η HDL (Zhang et al. 2003). Η έλλειψη apoA-I σε ποντίκια συνδέθηκε με την μειωμένη αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τα μακροφάγα στο ήπαρ αλλά και με μειωμένη αντι-φλεγμονώδη δραστηριότητα της HDL (Moore et al. 2005). Ο Navab και συνεργάτες έδειξαν ότι ποντίκια ανθεκτικά στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, είχαν αντιφλεγμονώδη HDL, δηλαδή HDL που εμποδίζει την οξείδωση της LDL και την ικανότητά της να επάγει χυμοτακτικά τα μονοκύτταρα. Σε αντίθεση, επίμυες που ήταν επιρρεπείς στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης είχαν προ-φλεγμονώδη HDL, δηλαδή HDL που ενισχύει την οξείδωση της LDL και την επαγωγή των μονοκυττάρων, χυμοτακτικά, όπως για παράδειγμα μέσω του MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) (Navab et al. 2005a). Η ιδιότητα της HDL

να επάγει χυμοτακτικά τα μονοκύτταρα, συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με την ικανότητα της HDL να επάγει αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από μακροφάγα στο ήπαρ (Navab et al. 2005a). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η HDL έχει ένα σημαντικό ρόλο στην καταστολή της φλεγμονής που προκαλεί η LDL.

Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων με αντι-οξειδωτικές ιδιότητες τα οποία σχετίζονται με την HDL (Navab et al. 2001), όπως η παραοξονάση (PON: paraoxonase), η PAF-AH (platelet-activating factor acetylhydrolase) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase). Αυτά τα ένζυμα έχουν την ιδιότητα να εμποδίζουν τον σχηματισμό των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων που μπορούν να επάγουν φλεγμονή (Berliner and Watson 2005). Είναι σημαντικό ότι πολύ πρόσφατα, η χρήση ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων έδειξε ότι στην HDL υπάρχουν περισσότερες πρωτεΐνες με αντιφλεγμονώδεις/ανοσολογικές λειτουργίες (23 από τις 48 συνολικά) παρά πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και την μεταφορά λιπιδίων (22 από τις 48) (Vaisar et al. 2007). Τα ένζυμα αυτά ρυθμίζονται αρνητικά από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Bielski and Forte 1999; Forte et al. 2002). Έχει προταθεί ότι υπό συνθήκες οξείας απόκρισης σε φλεγμονή (acute phase response) η HDL γίνονται προφλεγμονώδης (Van Lenten et al. 1995).

### **Ανάγκη προσδιορισμού δεικτών για τις ιδιότητες της HDL. Η κλινική δοκιμή ILLUMINATE.**

Η σημασία διαχωρισμού της HDL σε αντι-αθηρωματική/αντι-φλεγμονώδη και σε προφλεγμονώδη/αθηρωματώδη, καθώς και η σημασία ύπαρξης δεικτών για τον διαχωρισμό αυτό έγινε εμφανής μετά και από την πρόσφατη αποτυχία του αναστολέα της

CETP, torcetrapib. Η φαρμακευτική αναστολή του ενζύμου CETP αυξάνει τα επίπεδα του πληθυσμού των μεγάλων HDL σωματιδίων (Brousseau et al. 2004). Αυτό μπορεί να ενισχύει την έξοδο χοληστερόλης μέσω του ABCG1 μεταφορέα σε σχέση με τον ABCA1 (Wang et al. 2006; Matsuura et al. 2006). Ο αναστολέας του CETP, torcetrapib, χρησιμοποιήθηκε στην κλινική δοκιμή ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand Its Impact in Atherosclerotic Events) η οποία διεκόπη λόγω αυξημένων κρουσμάτων θανάτου στους ασθενείς που λάμβαναν τη θεραπεία. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν η αποτυχία οφείλεται σε τοξικότητα του φαρμάκου σε στόχους άλλους από την HDL ή στο μηχανισμό δράσης του (Nissen et al. 2007). Θα είναι ενδιαφέρον να δει κανείς τα αναμενόμενα συμπεράσματα από την ανάλυση των ευρημάτων αυτής της μελέτης και συγκεκριμένα εάν αλλαγές στα επίπεδα διαφόρων πληθυσμών της HDL ή στις ιδιότητές τους συνδέονται (και πώς) με τα αρνητικά αποτελέσματα της κλινικής έρευνας.

### **Η δράση της μυελο-υπεροξειδάσης (MPO) στην αποΑ-I**

Ο Hazen και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η αποΑ-I σε ανθρώπινο πλάσμα και σε αθηρωματικές πλάκες βρίσκεται να έχει τροποποιηθεί με προσθήκη νιτρικού οξέος (nitrated, NO<sub>2</sub>-) ή χλωρίου (chlorinated, Cl-) από το ένζυμο μυελοπεροξειδάση (MPO: myeloperoxidase). Αλλαγές στην αποΑ-I βρέθηκαν και στο πλάσμα ασθενών με αθηροσκλήρωση (Zheng et al. 2004). Συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr-192, Tyr-166, Tyr-236 και Tyr-29, με επικρατέστερες τις Tyr-192 και Tyr-166) είχαν υποστεί τις αλλαγές αυτές και εμφάνιζαν μειωμένη ικανότητα να επάγουν έξοδο χοληστερόλης μέσω του ABCA1, που σημαίνει ότι αυτά τα αμινοξέα είναι σημαντικά στη διαδικασία αυτή

(Zheng et al. 2005). Άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι απαιτείται ο συνδυασμός χλωρίωσης (chlorination) της Τυροσίνης-192 και οξείδωσης των αμινοξικών καταλοίπων μεθειονίνης για να χάσει η αποΑ-I την ικανότητά της να επάγει μεταφορά χοληστερόλης μέσω του ABCA1 (Shao et al. 2006). Αντίθετα, άλλοι υποστηρίζουν ότι τα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης ήταν δείκτες της δράσης της μυελοπεροξειδάσης παρά συγκεκριμένοι στόχοι, μιας και πειράματα με μόρια αποΑ-I που δεν περιείχαν τυροσίνη, έδειξαν ότι η αποΑ-I υφίσταται τροποποίηση από μυελοπεροξειδάση σε κατάλοιπα τρυπτοφάνης και λυσίνης που οδηγούν σε μείωση της ικανότητάς της να επάγει έξοδο χοληστερόλης μέσω του ABCA1 (Peng et al. 2005).

Η εκτίμηση των επιπέδων αποΑ-I που φέρει τις μετατροπές των τυροσινών στο πλάσμα και στις αθηρωματικές πλάκες (human atherosclerotic intima) έδειξε 6 φορές αύξηση της αποΑ-I στις πλάκες, ενώ παράλληλα οι νιτροτυροσίνες και η μυελοπερξειδάση συνεντοπίζονται (co-localize) στις περιοχές αυτές (Pennathur et al. 2004). Η HDL από ασθενείς με στεφανιαία νόσο, περιείχε διπλάσια νιτροτυροσίνη από αυτή των φυσιολογικών ατόμων-ελέγχου (Pennathur et al. 2004).

Φαίνεται λοιπόν ότι η HDL είναι προστατευτική, υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά μπορεί να γίνει βλαβερή λόγω οξειδωτικών διαδικασιών υπό συνθήκες φλεγμονής όπως η αθηροσκλήρωση. Η λειτουργικότητα της HDL και τα πλεονεκτήματα που κάθε θεραπεία προσφέρει στους ασθενείς μπορεί να εξαρτάται περισσότερο από τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν στην αύξηση της HDL-χοληστερόλης παρά στο απόλυτο μέγεθος αυτής της αύξησης.

## ΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μια από τις προσπάθειες αντιμετώπισης και θεραπείας της αθηρωμάτωσης και μείωσης των λιπιδίων είναι και η χρήση των μιμητικών πεπτιδίων των απολιποπρωτεϊνών (mimetic peptides). Ο Navab και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι χορήγηση (oral administration) ενός μιμητικού πεπτιδίου της αποΑ-I, του D-4F, μείωσε την αθηροσκλήρωση σε ποντίκια, χωρίς να προκαλέσει αλλαγή στα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα (Navab et al. 2003). Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήσαν ήταν βασισμένα στην αλληλουχία «Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH<sub>2</sub>» (Ac-18A-NH<sub>2</sub> or 2F). Πεπτίδια που αποτελούνται από L-αμινοξέα χαρακτηρίζονται με «L» (π.χ. L-4F) και πεπτίδια που αποτελούνται από D-αμινοξέα με «D» (π.χ. D-4F) (Navab et al. 2002).

Επίμυες με έλλειψη αποE (αποE<sup>-/-</sup>), τα οποία ακόμα και σε δίαιτα χαμηλή σε λιπαρά εμφανίζουν υπερλιπιδαιμία και αθηρωμάτωση, βρέθηκαν να έχουν προ-φλεγμονώδη HDL η οποία μετατράπηκε σε αντι-φλεγμονώδη μετά την χορήγηση του D-4F. Και σε αυτή την περίπτωση, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης και της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος (Navab et al. 2003).

Ο μηχανισμός δράσης του D-4F στα ποντίκια, φαίνεται να περιλαμβάνει το σχηματισμό preβ-HDL, την βελτίωση της ικανότητας επαγωγής εξόδου χοληστερόλης μέσω της HDL και αύξηση της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από μακροφάγα στο ήπαρ, *in vivo* (Navab et al. 2004).

Τέλος, χορήγηση του πεπτιδίου D-4F (12.5 μg/ημέρα) σε αποE<sup>-/-</sup> επίμυες σε συνδυασμό με την στατίνη πραβαστατίνη (pravastatin) (50 μg/ημέρα), για 17 εβδομάδες,

μετέτρεψε την HDL σε προστατευτική και προκάλεσε ακόμα και υπαναχώρηση (regression) της αθηρωμάτωσης κατά 38% (Navab et al. 2005b).

Εκτός του μιμητικού πεπτιδίου της αποΑ-I, έχει αναφερθεί και η χορήγηση μιμητικού πεπτιδίου που βασίζεται στην απολιποπρωτεΐνη J σε ποντίκια και πιθήκους, που μετέτρεψε την HDL σε προστατευτική μορφή ενώ μείωσε την αθηρωμάτωση σε επίμυες αποE<sup>-/-</sup> (Navab et al. 2005d). Ακόμα, πεπτίδια που είναι αρκετά μικρά για να σχηματίσουν δομές έλικας φαίνεται να έχουν το ίδιο αποτέλεσμα (Navab et al. 2005c).

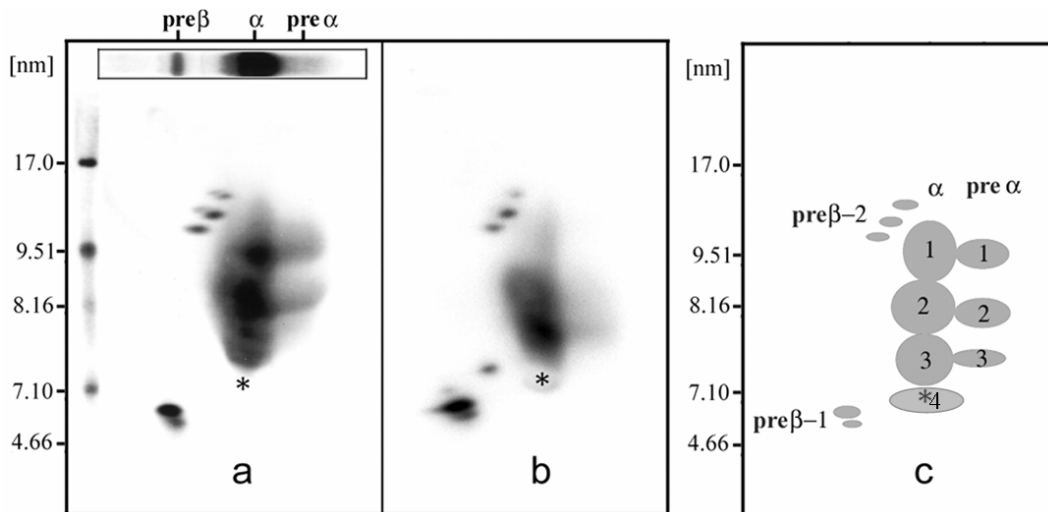
Ο κοινός τρόπος δράσης των πεπτιδίων αυτών θεωρείται ότι σχετίζεται με την ικανότητά τους να απομακρύνουν οξειδωμένα λιπίδια που αναστέλουν την δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων της HDL (Shah and Chyu 2005). Με την προστασία αυτή, η αποΑ-I δρα στο μέγιστο και επάγει την έξοδο χοληστερόλης, αυξάνοντας τα ποσά της preβ-HDL, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνεται η ισορροπία μεταξύ φλεγμονώδους και αντιφλεγμονώδους HDL .

## **ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΗΣ HDL ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ**

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η HDL βρίσκεται στο πλάσμα σε διάφορες μορφές με βάση την περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Έτσι, οι υποπληθυσμοί της HDL διαφέρουν, εκτός από την πυκνότητά και το μέγεθός τους (Πίνακας I), και ως προς το φορτίο τους. Η ανάλυση των σωματιδίων της HDL του πλάσματος σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων μπορεί να διαχωρίσει την HDL με βάση το φορτίο και το μέγεθός της. Οι υποκατηγορίες αυτές χαρακτηρίζονται, στην πρώτη διάσταση, με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα και σε σχέση με την αλβουμίνη σε preβ- (μεταναστεύουν με πιο αργό

ρυθμό), α- (με παρόμοια κινητικότητα) και preα- (με πιο γρήγορη κινητικότητα), ενώ στη δεύτερη διάσταση, με βάση το φορτίο και το μέγεθός τους, οι κατηγορίες χωρίζονται σε preβ-1 και -2, και σε α1, α2, α3 και α4 (**Εικόνα 12c**). Ο Asztalos και οι συνεργάτες του, μελέτησαν τους πληθυσμούς των σωματιδίων που σχηματίζονται στο πλάσμα υγιών ανθρώπων και ασθενών με στεφανιαία νόσο χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D). Στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο τα βασικά συστατικά της HDL, η apoA-I και η HDL-χοληστερόλη, δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τα υγιή άτομα. Είναι όμως ενδιαφέρον ότι, όπως αναφέρουν οι ερευνητές, η εικόνα των υποπληθυσμών της HDL που περιέχει apoA-I, διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης, και χαρακτηρίζεται από σημαντική ανακατανομή των HDL σωματιδίων που περιέχουν apoA-I. Τα επίπεδα των υποπληθυσμών της α1-HDL καθώς και της pre-α-HDL ήταν σημαντικά μειωμένα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, σε σχέση με τα υγιή άτομα, ενώ το ποσοστό των pre-β σωματιδίων εμφανίστηκε αυξημένο (Asztalos et al. 2000) (**Εικόνα 12a,b**). Φαίνεται δηλαδή, ότι στα άτομα αυτά η ωρίμανση των φτωχών σε λιπίδια pre-β1-HDL σωματιδίων σε μεγαλύτερα, δισκοειδή και σφαιρικά σωματίδια της HDL είναι ελλατωματική. Η ίδια ομάδα ερευνητών, σε μετα-ανάλυση των ευρημάτων της κλινικής δοκιμής VA-HIT (Veterans Affairs HDL Intervention Trial), και χρησιμοποιώντας ανάλυση του πλάσματος σε δύο διαστάσεις, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι συγκεκριμένοι πληθυσμοί HDL, καθώς και η αναλογία α-/preβ- HDL σωματιδίων, αποτελούν πιο ακριβείς δείκτες επανεμφάνισης στεφανιαίας νόσου από ότι τα απόλυτα επίπεδα HDL-χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, υποστηρίζουν ότι σημαντικότεροι δείκτες είναι οι πληθυσμοί των των α1- και α2-HDL σωματιδίων, έλλειψη των οποίων παρατηρείται στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο (Asztalos et al. 2005).





**Εικόνα 12a-c.** Ανάλυση της HDL ανθρώπινου πλάσματος που περιέχει apoA-I, σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα δύο διαστάσεων, με βάση το φορτίο και το μέγεθος των σωματιδίων. a) δείγμα από φυσιολογικό άτομο (control). Το ένθετο σχήμα στο επάνω μέρος απεικονίζει την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1<sup>η</sup> διάσταση) η οποία διαχωρίζει την HDL με βάση το φορτίο σε preβ-, α- και preα-ηλεκτροφορητικές κινητικότητες. Ο αστερίσκος (\*) αντιπροσωπεύει την θέση της ανθρώπινη αλβουμίνης του πλάσματος (α-κινητικότητα), b) δείγμα από ασθενή με στεφανιαία νόσο (Asztalos et al. 2004; Zannis et al. 2006) c) σχηματική επεικόνιση των HDL σωματιδίων που περιέχουν apoA-I. Βασισμένη, με μετατροπές, στους (Asztalos et al. 2004) .

## **ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I**

Απουσία την αποΑ-I στον άνθρωπο είναι σπάνια και συνήθως συνοδεύεται από εκδήλωση πρώιμης αθηροσκλήρωσης, εμφάνιση ξανθωμάτωσης και βλάβες στον κερατοειδή χιτώνα (corneal clouding) (Matsunaga et al. 1991; Norum et al. 1982; Schaefer et al. 1985) .

Έχουν περιγραφεί ποικίλες μεταλλάξεις της αποΑ-I στον άνθρωπο που προκαλούνται κυρίως από αντικαταστάσεις αμινοξέων. Γενικά, οι μεταλλάξεις της αποΑ-I χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Αυτές που επηρεάζουν τα επίπεδα της HDL στους φορείς τους, αυτές που προκαλούν αμυλοείδωση (amyloidosis) και αυτές που δεν προκαλούν μεταβολές στην HDL (Sorci-Thomas and Thomas 2002).

### **ΑποΑ-I και Αμυλοείδωση**

Η Κληρονομική Αμυλοείδωση (αλλιώς γνωστή και ως οικογενής αμυλοειδική πολυνευροπάθεια, FAP: familial amyloidotic polyneuropathy,) είναι μια αυτοσωμική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από εξοκυττάρια συσσώρευση αδιάλυτων ινιδίων αμυλοειδούς που οφείλεται σε απόθεση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ή τμημάτων πρωτεϊνών που προέρχονται από πρωτεόλυση και προκαλούν νευροπάθεια ποικίλου βαθμού, νεφροπάθεια και καρδιομυοπάθεια.. Τα ινίδια προοδευτικά συσσωρεύονται και προκαλούν δυσλειτουργία των οργάνων και μπορεί να οδηγήσει και σε θάνατο. Η μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I<sub>Iowa</sub>, βρέθηκε σε ασθενείς που πέθαναν από αμυλοείδωση η οποία χαρακτηρίστηκε από την συσσώρευση της αμινοτελικής περιοχής (1-83 αμινοξέα της αποΑ-I<sub>Iowa</sub>) στα ινίδια του αμυλοειδούς. Η μετάλλαξη αυτή χαρακτηρίζεται απο αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση 26 της αποΑ-I από το αμινοξύ γλυκίνη (Nichols

et al. 1988). Επτά ακόμα μεταλλάξεις της αποΑ-I έχουν αναφερθεί οι οποίες σχετίζονται με αμυλοείδωση και χαμηλά επίπεδα HDL. Είναι χαρακτηριστικό ότι όλες αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο αμινοτελικό κομμάτι της αποΑ-I (Sorci-Thomas and Thomas 2002). Μελέτες σε ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη αποΑ-I<sub>Iowa</sub> δείχνουν ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη υπόκειται σε αυξημένο καταβολισμό στο πλάσμα. Έχει προταθεί μετά την πρωτεόλυση της αποΑ-I, το αμινοτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης αποκτά μια ασταθή μορφή η οποία προκαλεί το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων (Rader et al. 1992).

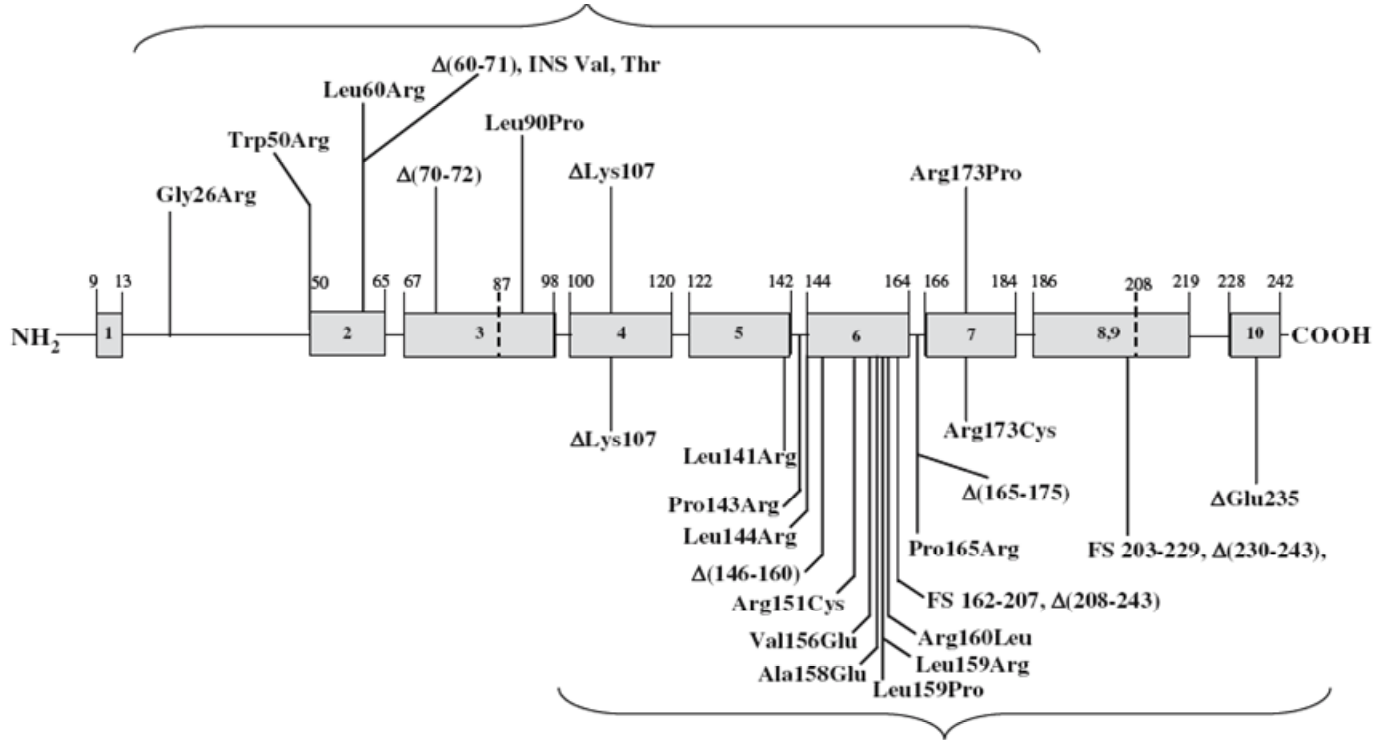
### **Μεταλλάξεις της ΑποΑ-I επηρεάζουν την ωρίμανση της HDL**

Οι μεταλλάξεις της αποΑ-I που επηρεάζουν τα επίπεδα της HDL είναι κυρίως σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην περιοχή της έλικας 6 της αποΑ-I ή γύρω από αυτήν (**Εικόνα 13**). Στους φορείς αυτών των μεταλλάξεων που συνήθως είναι ετεροζυγώτες, τα επίπεδα της HDL μειώνονται στο μισό του φυσιολογικού. *In vitro* μελέτες αυτών και άλλων μεταλλάξεων στην περιοχή της έλικας 6, δείχνουν σημαντική μείωση της ικανότητας της αποΑ-I να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT. Συγκεκριμένες μεταλλαγμένες μορφές που μελετήθηκαν κατά την παρούσα διατριβή είναι οι εξής:

#### **Η αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>**

Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση του υδρόφοβου αμινοξέος Λευκίνη (Leu) στη θέση 141 της αποΑ-I από το θετικά φορτισμένο αμινοξύ Αργινίνη (Arg). Η θέση του αμινοξέος αυτού τοποθετεί στο τέλος της έλικας 5, με βάση την δομή που έχει

**αποΑ-I μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αμυλοϋδωση και χαμηλά επίπεδα HDL**



**αποΑ-I μεταλλάξεις σχετιζόμενες με μειωμένη ενεργοποίηση LCAT ή/και χαμηλά επίπεδα HDL**

**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση των φυσικά απαντώμενων μεταλλάξεων στην πρωτεϊνική αλληλουχία της αποΑ-I που προκαλούν παθολογικούς φαινότυπους. Τα σκιασμένα κουτιά αντιπροσωπεύουν τις α-έλικες του μορίου όπως αυτές προβλέπονται από την αλληλουχία της αποΑ-I. (Βασισμένο, με μετατροπές, στους (Sorci-Thomas and Thomas 2002; Zannis et al. 2006).

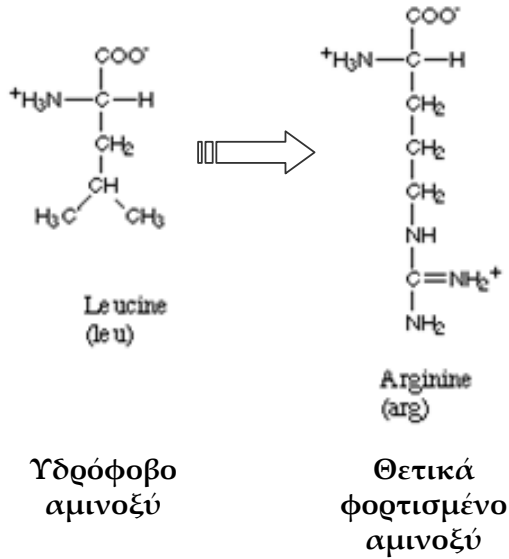
προταθεί από την αλληλουχία της αποΑ-I (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999), ή στην αλληλουχία σύνδεσης (θηλειά) μεταξύ των ελίκων C και D, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή όπως αυτή αναλύθηκε από τους Ajees et al. (Ajees et al. 2006) **(Εικόνα 14)**.

Ασθενείς που είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες για ένα ελλειμματικό (null) αλληλόμορφο της αποΑ-I ενώ το άλλο αλληλόμορφο φέρει το γονίδιο της αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> (αναφέρονται και ως ημιζυγώτες) παρουσιάζουν έλλειψη HDL χοληστερόλης και δραματική μείωση στην συγκέντρωση της αποΑ-I στον ορό του αίματος. Στα άτομα αυτά τα επίπεδα LDL χοληστερόλης εμφανίζονται αυξημένα (Miccoli et al. 1996). Ετεροζυγώτες μόνο για το αλληλόμορφο της αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> εμφανίζουν επίπεδα HDL χοληστερόλης και αποΑ-I στο 50% του φυσιολογικού (Miccoli et al. 1996; Pisciotta et al. 2003). Τρεις σύνθετοι ετεροζυγώτες για την αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και ένας ετεροζυγώτης εμφάνιζαν στένωση των στεφανιαίων αγγείων. Όπως και σε ασθενείς με ασθένεια Tangier και έλλειψη LCAT, οι σύνθετοι ετεροζυγώτες της αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση της προαποΑ-I στο πλάσμα σε σχέση με την ώριμη αποΑ-I γεγονός που ερμηνεύεται ως δείκτης υψηλού ρυθμού καταβολισμού της αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> που συμβάλει στην έλλειψη HDL (Miccoli et al. 1996).

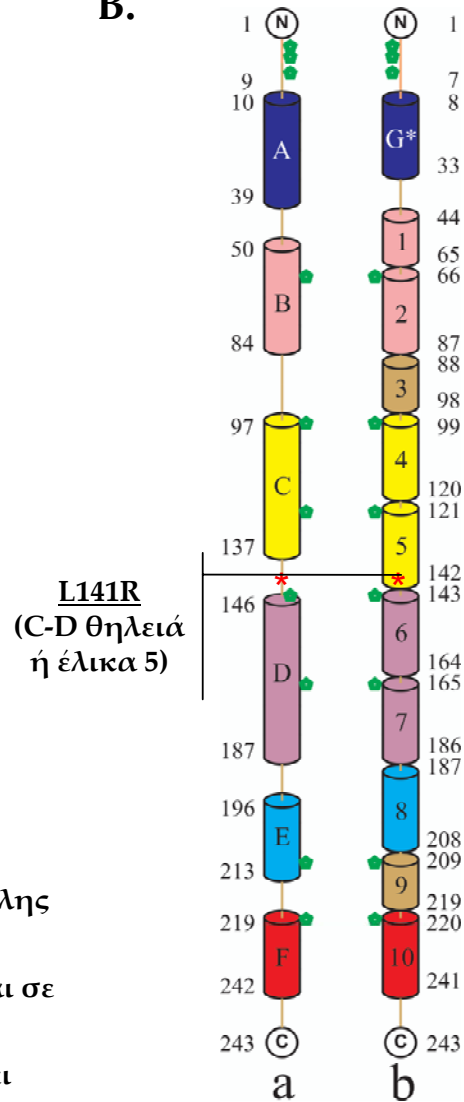
Επόμενες μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητα του πλάσματος από 4 σύνθετους ετεροζυγώτες της αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> να επάγει εστεροποίηση της χοληστερόλης τόσο σε εξωγενές υπόστρωμα (rHDL) όσο και σε ενδογενές (λιποπρωτεΐνες του πλάσματος) εμφάνιζε σημαντική μείωση (Miccoli et al. 1997). Η ανάλυση σε δύο διαστάσεις του πλάσματος από σύνθετους ετεροζυγώτες έδειξε την παρουσία preβ-HDL και χαμηλές συγκεντρώσεις μικρών σωματιδίων α-ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (αντιστοιχούν στα α4-HDL σωματίδια). Ανάλυση των preβ- σωματιδίων από το πλάσμα ετεροζυγωτών έδειξε ότι τα σωματίδια αυτά περιέχουν την αγρίου τύπου αποΑ-I και την μεταλλαγμένη μορφή σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, ενώ η μεταλλαγμένη μορφή λείπει από μεγάλου μεγέθους σωματίδια α-κινητικότητας (που αντιστοιχούν στα α1-HDL σωματίδια). Έγιναν πειράματα κατά τα οποία επώαση πλάσματος από φυσιολογικά

## apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>

**A.**



**B.**



### Κλινική εικόνα των φορέων

- Έλλειψη HDL σε ημιζυγώτες
- Υπο-α-λιποπρωτεϊναιμία και υποδιπλασιασμός της HDL-χοληστερόλης σε ετεροζυγώτες
- Παρουσία της πρωτεΐνης σε pre-β1 και σε μικρού μεγέθους α-σωματίδια
- Πλάσμα από ημιζυγώτες παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα εστεροποίησης και εξόδου χοληστερόλης (Miccoli *et al.*, 1997)

**Εικόνα 14.** Σχηματική απεικόνιση της μετάλλαξης apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και περιγραφή της κλινικής εικόνας των ασθενών-φορέων της μετάλλαξης. A. Η αμινοξική αντικατάσταση, B. Η θέση της μετάλλαξης στη δομή της apoA-I όπως προβλέπεται από την (a) κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Ajees *et al.* 2006) και (b) από την δευτεροταγή της δομή (Borhani *et al.* 1997; Borhani *et al.* 1999).

άτομα είτε με PBS (δείγμα αρνητικού ελέγχου) είτε με πλάσμα ελλειμματικό για την apoA-I (apoA-I<sup>-/-</sup>) φάνηκε να μειώνει τα preβ- και να αυξάνει τα α-HDL σωματίδια. Το ίδιο πείραμα με πλάσμα από ασθενείς με Tangier disease έδειξε ότι το PBS δεν μεταβάλλει τα σωματίδια αλλά επώαση με apoA-I<sup>-/-</sup> πλάσμα μετατρέπει τα preβ- (που φέρουν αγρίου τύπου apoA-I) σωματίδια σε α-HDL. Το ίδιο πείραμα με πλάσμα από σύνθετους ετεροζυγώτες για την apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> έδειξε ότι τα preβ-σωματίδια δεν μετατρέπονται σε α-σωματίδια. Οι συγγραφείς συμπεραίνουν από τα παραπάνω ότι η μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, ενώ μπορεί και σχηματίζει preβ-σωματίδια, εμποδίζει το σχηματισμό ώριμων α-HDL σωματιδίων (Miccoli et al. 1997).

Ο Miccoli και οι συνεργάτες του, εξέτασαν, επίσης, την ικανότητα πλάσματος από σύνθετους ετεροζυγώτες να επάγει την έξοδο χοληστερόλης από ινοβλάστες, την οποία υπολόγισαν σε 58% αυτής που επάγει πλάσμα από φυσιολογικά άτομα, και έτσι υποστήριξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> επηρεάζει την έξοδο χοληστερόλης (Miccoli et al. 1997).

Είναι φανερό ότι είναι αναγκαία η μελέτη των αλληλεπιδράσεων της apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> με τον ABCA1 και την LCAT *in vitro* και *in vivo* σε σύστημα ελεύθερο από αγρίου τύπου apoA-I (π.χ. ποντίκια ελλειμματικά για την apoA-I του ποντικού που να είναι ομόζυγα ως προς την apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> του ανθρώπου) ώστε να εξακριβωθεί σε ποιο στάδιο και με ποιό τρόπο αυτή η μεταλλαγμένη μορφή επηρεάζει την βιογένεση της HDL, κάτι που είναι αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

### **Η αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>**

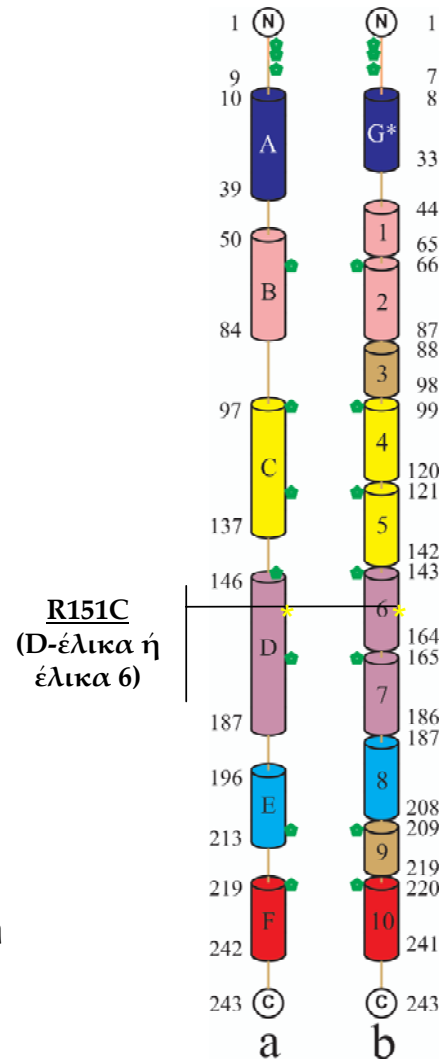
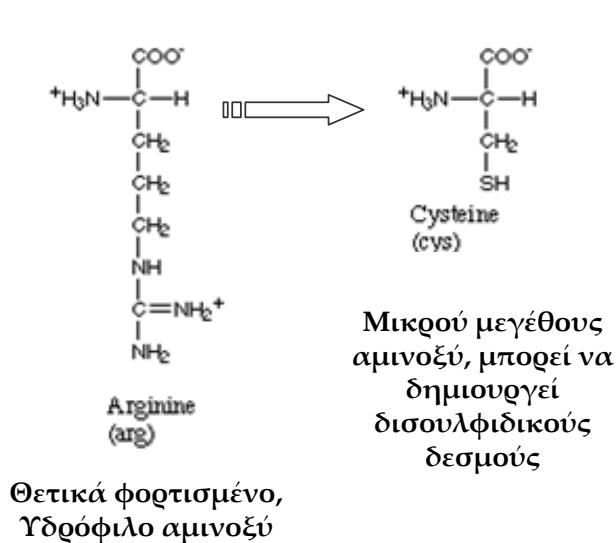
Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση του θετικά φορτισμένου αμινοξέος Αργινίνη (Arg) στην θέση 151 της αποA-I από το μικρού μεγέθους αμινοξύ Κυστεΐνη (Cys) το οποίο λόγω της ομάδας υδρόθειου (-SH) που περιέχει μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ 2 μορίων αποA-I. Η θέση του αμινοξέος αυτού τοποθετεί στην έλικα 6, με βάση την δομή που έχει προταθεί από την αλληλουχία της αποA-I (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999), ή στην έλικα D, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή όπως αυτή αναλύθηκε από τους Ajees et al. (Ajees et al. 2006) (**Εικόνα 15**).

Ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> εμφάνισαν 50% μειωμένη HDL χοληστερόλη και 65% μειωμένη αποA-I στο πλάσμα τους, σε σχέση με φυσιολογικά άτομα. Η δραστηριότητα του πλάσματος των φορέων της μετάλλαξης να επάγουν εστεροποίηση χοληστερόλης (δραστηριότητα LCAT) σε ανασυνδυασμένης HDL (rHDL) βρέθηκε μειωμένη στο 16% των φυσιολογικών τιμών (Bruckert et al. 1997). Σε όλους τους ετεροζυγώτες η συγκέντρωση της HDL2 και HDL3 ήταν μειωμένη και το μεγαλύτερο μέρος της HLD-χοληστερόλης ήταν σε σωματίδια που αντιστοιχούν στην HDL3. Επιπροσθέτως, τα HDL σωματίδια είχαν περισσότερα φωσφολιπίδια αναλογικά με την χοληστερόλη που περιείχαν. Οι φορείς της μεταλλαγμένης μορφής αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> δεν παρουσίασαν συμπτώματα στεφανιαίας νόσου (Bruckert et al. 1997).

Πειράματα *in vitro* με την πρωτεΐνη αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> έδειξαν ότι σχηματίζει διμερή σε ποσοστό 40%, ενώ φαίνεται να διαλυτοποιεί μικυλία λιπιδίων DMPC.



αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>



Κλινική εικόνα φορέων

- Ετερόζυγα άτομα εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα HDL και apoA-I στο πλάσμα τους. Δεν εμφανίζουν καρδιαγγειακές παθήσεις.
- Η apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> εμφανίζει μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης της LCAT αλλά φυσιολογική ικανότητα επαγωγής εξόδου χοληστερόλης (Daum *et al.* 1999)

**Εικόνα 15.** Σχηματική απεικόνιση της μετάλλαξης apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και περιγραφή της κλινικής εικόνας των ασθενών-φορέων της μετάλλαξης. Α. Η αμινοξική αντικατάσταση, Β. Η θέση της μετάλλαξης στη δομή της apoA-I όπως προβλέπεται από την (a) κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Ajees *et al.* 2006) και (b) από την δευτεροταγή της δομής (Borhani *et al.* 1997; Borhani *et al.* 1999).

(dimyristoylphosphatidylcholine) στον ίδιο βαθμό με την αγρίου τύπου αποΑ-I (Daum et al. 1999a). Σε πειράματα σχηματισμού rHDL, η αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> σχημάτισε τρεις πληθυσμούς σωματιδίων με μέση διάμετρο 9,3 nm, 10.6 nm και 12.1 nm, ενώ η αγρίου τύπου μορφή σχημάτισε μόνο τα 9,3 nm διαμέτρου σωματίδια (Daum et al. 1999a). Η ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να ενεργοποιήσει την δράση του ενζύμου LCAT μετρήθηκε και βρέθηκε μειωμένη κατά 60%, λόγω αυξημένης, κατά 50%, Km.

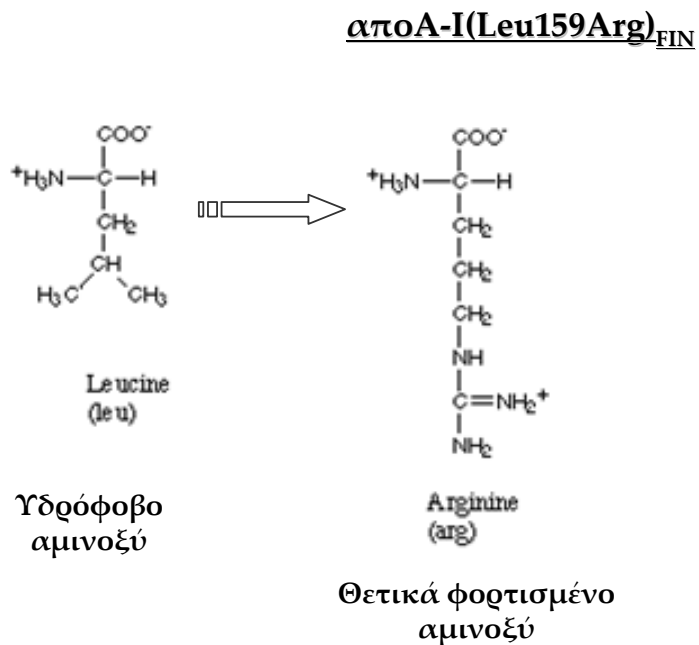
Η έξοδος χοληστερόλης που επάγει η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη από μακροφάγα του ποντικού μετά από 18 ώρες επώασης βρέθηκε παρόμοια με αυτή της αγρίου τύπου αποΑ-I (Daum et al. 1999a), ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στην έξοδο χοληστερόλης από J774 μακροφάγα κύτταρα ενεργοποιημένα με το ανάλογο cAMP που επάγει τον ABCA1 ή απουσία του αναλόγου cAMP (Bielicki and Oda 2002). Το cAMP επάγει την έκφραση του ABCA1.

Είναι φανερό ότι είναι αναγκαία η μελέτη αυτής της μεταλλαγμένης μορφής *in vivo*, σε σύστημα ελεύθερο από αγρίου τύπου αποΑ-I ώστε να εξακριβωθεί σε ποιο στάδιο και με ποιό τρόπο η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει τις ιδιότητες της αποΑ-I καθώς και την βιογένεση της HDL, κάτι που αποτελεί αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

### **Η αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>**

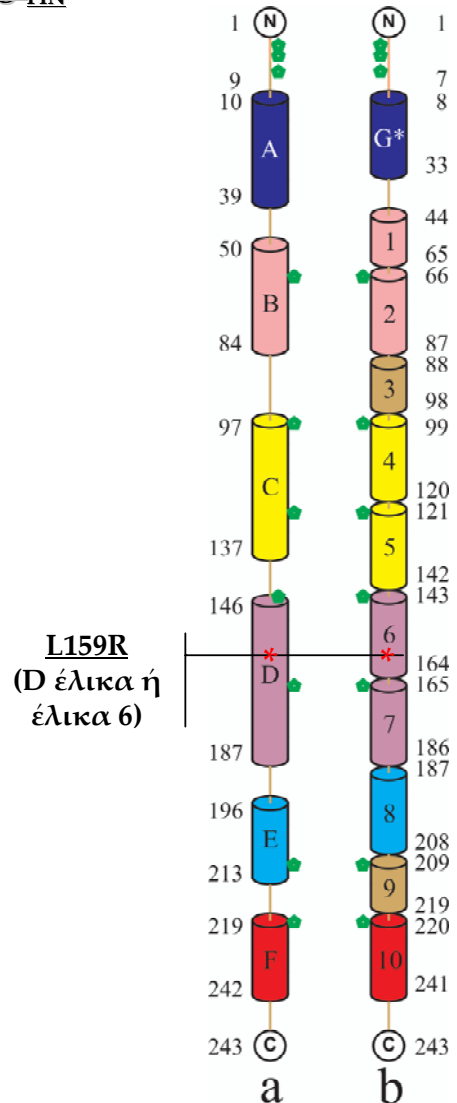
Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση του υδρόφοβου αμινοξέος Λευκίνη (Leu), στην θέση 151 της αποA-I, από το θετικά φορτισμένο αμινοξύ Αργινίνη (Arg). Η θέση του αμινοξέος αυτού το τοποθετεί στην έλικα 6, με βάση την δομή που έχει προταθεί από την αλληλουχία της αποA-I (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999), ή στην έλικα D, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή όπως αυτή αναλύθηκε από τους Ajees et al. (Ajees et al. 2006) (**Εικόνα 16**).

Ο Miettinen και οι συνεργάτες του, μελέτησαν εννέα μέλη μιας οικογένειας 18 ατόμων, τα οποία ήταν ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> και βρήκαν ότι τα άτομα αυτά εμφάνιζαν μειωμένα, κατά 80%, επίπεδα HDL-χοληστερόλης και μειωμένα κατά 75% επίπεδα αποA-I σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (control) (Miettinen et al. 1997a). Η ισχυρή επίδραση που φαίνεται να έχει αυτή η μεταλλαγμένη μορφή της αποA-I στο φαινότυπο των ετεροζυγωτών υποδεικνύει ότι πρόκειται για μετάλλαξη με επικρατή φαινότυπο στο μεταβολισμό της HDL στους φορείς της. Ανάλυση των λιποπρωτεϊνών με βάση την πυκνότητα επίπλευσής τους μέσω υπερφυγοκέντρωσης του πλάσματος έδειξε ότι η HDL χοληστερόλη στο πλάσμα των ετεροζυγωτών κατανέμεται κυρίως στην περιοχή πυκνότητας της HDL3. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και από ανάλυση του πλάσματος σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (native PAGE) που έδειξε ότι η αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> ανιχνεύεται σε σωματίδια μεγέθους μεταξύ 7,8 με 8,9 nm το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος των HDL3 σωματιδίων (Miettinen et al. 1997b). Τα επίπεδα των εστέρων χοληστερόλης του πλάσματος και της HDL ήταν χαμηλότερα στους



**Κλινική εικόνα φορέων**

- Επικρατής κληρονομική υπο-α-λιποπρωτεΐναιμία
- Παρουσία σωματιδίων τύπου HDL3 και έλλειψη HDL2 στο πλάσμα.
- rHDL με την apoA-I<sub>FIN</sub> εμφανίζει μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης της LCAT αλλά δεν επηρεάζει την έξοδο χοληστερόλης (Miettinen *et al.*, 1997, McManus *et al.*, 2001).



**Εικόνα 16.** Σχηματική απεικόνιση της μετάλλαξης apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> και περιγραφή της κλινικής εικόνας των ασθενών-φορέων της μετάλλαξης. Α. Η αμινοξική αντικατάσταση, Β. Η θέση της μετάλλαξης στη δομή της apoA-I όπως προβλέπεται από την (a) κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (Ajees *et al.* 2006) και (b) από την δευτεροταγή της δομή (Borhani *et al.* 1997; Borhani *et al.* 1999)

ετεροζυγώτες σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (Miettinen et al. 1997a; Miettinen et al. 1997b), γεγονός που υποδεικνύει μείωση του ρυθμού εστεροποίησης της χοληστερόλης. In vitro πειράματα έδειξαν μειωμένη ικανότητα εστεροποίησης χοληστερόλης από το πλάσμα των ετεροζυγωτών ενώ πειράματα με rHDL που περιέχει την apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> έδειξαν 60% μείωση της ικανότητας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να ενεργοποιήσει το ένζυμο LCAT (Miettinen et al. 1997b). Η αποσαφήνιση της επίδρασης της apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> στην ενεργοποίηση της LCAT απαιτεί συγκριτικά in vitro πειράματα με rHDL από φυσιολογική apoA-I και από apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> ως συμπαραγώντες (cofactors) της LCAT.

Η ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> να επάγει την έξοδο χοληστερόλης από ινοβλάστες ανθρώπου δοκιμάστηκε από τους ίδιους ερευνητές με τη χρήση HDL από πλάσμα απομονωμένο από ετεροζυγώτες ασθενείς καθώς και με rHDL που περιείχε πρωτεΐνη apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>. Και στις δύο δοκιμασίες η έξοδος χοληστερόλης ήταν παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε σε ανάλογα πειράματα με την αγρίου τύπου apoA-I (Miettinen et al. 1997b). Φαίνεται δηλαδή ότι η μεταλλαγμένη αυτή μορφή δεν επηρεάζει την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα. Είναι όμως αναγκαία η περαιτέρω μελέτη αυτής της μεταλλαγμένης μορφής της apoA-I σε σύστημα ελεύθερο από αγρίου τύπου apoA-I, δεδομένου ότι η παρουσία άλλων πρωτεϊνών ενδέχεται να επηρεάζουν την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα.

Μελέτη του καταβολισμού της apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> στους ετεροζυγώτες έδειξαν ότι ήταν αυξημένος, σε σχέση με τον καταβολισμό της apoA-I στα άτομα-ελέγχου. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγεί την σημαντική μείωση στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της apoA-I στους φορείς της μετάλλαξης (Miettinen et al. 1997a;

Miettinen et al. 1997b). Αύξηση του καταβολισμού της αποΑ-I έχει παρατηρηθεί σε αρκετές κληρονομικές ασθένειες όπως σε φορείς των μεταλλάξεων αποΑ-I<sub>Milano</sub> (Roma et al. 1993) και αποΑ-I<sub>Iowa</sub> (Rader et al. 1992), σε ασθενείς Tangier (Schaefer et al. 1978) και σε καταστάσεις έλλειψης του ενζύμου LCAT (Gylling and Miettinen 1992).

Οι φορείς της μετάλλαξης για την αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> που μελέτησαν οι Miettinen et al. δεν παρουσίασαν κλινικά σημάδια στεφανιαίας νόσου παρά τα πολύ χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης που είχαν. Ένα μόνο μέλος της οικογένειας είχε υποστεί εγχείρηση bypass σε ηλικία 60 ετών και δεν είχε άλλους παράγοντες κινδύνου εκτός της χαμηλής HDL λόγω της μετάλλαξης. Ο κίνδυνος όμως εκδήλωσης της ασθένειας δεν μπορεί να εκτιμηθεί λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος (9 άτομα) και του νεαρού της ηλικίας πέντε εκ των ατόμων αυτών (Miettinen et al. 1997b).

Σε μεταγενέστερες μελέτες σε C57BL/6L και αποΑ-I<sup>-/-</sup> επίμυες χρησιμοποιήθηκε μεταφορά του γονιδίου της αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> μέσω αδενοϊών. Στα πειράματα αυτά αναφέρθηκε ο σχηματισμός μόνο μικρών σωματιδίων HDL, μεγέθους 8-9 nm. Σε επίμυες που εξέφραζαν τόσο την αγρίου τύπου αποΑ-I όσο και την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, η τελευταία εντοπίστηκε κυρίως σε preβ-HDL σωματίδια (McManus et al. 2001). Η έλλειψη μεγάλου μεγέθους σωματιδίων HDL στα παραπάνω πειράματα ακολουθεί το πρότυπο των ετεροζυγωτών-ασθενών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Miettinen et al. 1997b). Ανάλυση σε μία διάσταση σε πήκτωμα αγαρόζης, έδειξε ότι η αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> εντοπίζεται κυρίως στα preβ1-HDL σωματίδια.

Οι συγγραφείς ανέφεραν την παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης της πρωτεΐνης αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> στο πλάσμα τόσο των C57BL/6 όσο και των αποΑ-I<sup>-/-</sup> ποντικών. Παρουσιάστηκαν, επίσης, δεδομένα που δείχνουν μείωση των επιπέδων έκκρισης της

πρωτεΐνης αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> από ηπατοκύτταρα ποντικού έπειτα από μεταφορά του γονίδιου μέσω αδενοϊών (McManus et al. 2001). Τα παραπάνω εξηγούν, σύμφωνα με τους συγγραφείς, την μειωμένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> στο πλάσμα των ποντικών και των ετεροζυγωτών ασθενών.

Η ικανότητα της αποA- I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> να ενεργοποιεί την LCAT εκτιμήθηκε μέσω πειραμάτων με rHDL που περιείχε καθαρή πρωτεΐνη και βρέθηκε μειωμένη τόσο λόγω αύξησης της φαινομενικής Km όσο και λόγω μείωσης της φαινομενικής Vmax της αντίδρασης εστεροποίησης της χοληστερόλης (McManus et al. 2001).

Τέλος, σε πειράματα με καθαρή ελεύθερη-λιπιδίων πρωτεΐνη αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> αλλά και με rHDL που περιέχει την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δεν βρέθηκαν διαφορές στην ικανότητα της πρωτεΐνης να επάγει έξοδο χοληστερόλης από J774 μακροφάγα κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί ή μη από cAMP, σε σχέση με την WT αποA-I (McManus et al. 2001). Αυτό υποδεικνύει ότι αυτή η μεταλλαγμένη μορφή της αποA-I δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον μεταφορέα ABCA1 που αποτελεί το πρώτο βήμα στην λιπιδίωση της αποA-I και το σχηματισμό της HDL.

Στοιχεία για τους μηχανισμούς με τους οποίους η αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> συμβάλλει στα χαμηλά επίπεδα HDL και τρόποι αποκατάστασης των φυσιολογικών επιπέδων HDL σε πειραματόζωα αποτελούν τα ευρήματα της παρούσας διατριβής.

### **Η αποΑ-I(Leu178Pro)**

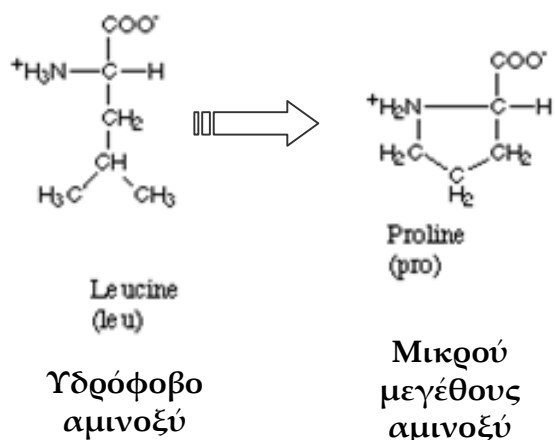
Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση του υδρόφοβου αμινοξέος Λευκίνη (Leu) από το μικρού μεγέθους αμινοξύ Προλίνη (Pro), στην θέση 178 της αποΑ-I. Η θέση του αμινοξέος αυτού τοποθετεί στην έλικα 7, με βάση την δομή που έχει προταθεί από την αλληλουχία της αποΑ-I (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999), και στην έλικα D, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή όπως αυτή αναλύθηκε από τους Ajees et al. (Ajees et al. 2006) (**Εικόνα 17**)

Οι Hovingh et al. περιέγραψαν μια καινούρια μετάλλαξη της αποΑ-I (Hovingh et al. 2004), την αποΑ-I(Leu178Pro), η οποία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης όπως εκτιμήθηκε από το αυξημένο πάχος intimal-medial της καροτίδας (IMT: intimal-medial thickness) και την ελαττωμένη διαστολή λόγω ροής (FMD: flow-mediated dilation). Αρχικά βρήκαν έξι άτομα, όλα από την ίδια γεωγραφική περιοχή της Ολλανδίας, με μία σημειακή μετάλλαξη που οδηγούσε στην αντικατάσταση της λευκίνης από την προλίνη στην θέση 178 της αποΑ-I. Τελικά αναγνώρισαν 6 οικογένειες με 54 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη και 147 μέλη ως άτομα ελέγχου. Ανάλυση στο σύνολο αυτών των ατόμων έδειξε ότι η μετάλλαξη αυτή σχετίζεται με μέση μείωση κατά 52% στα επίπεδα της αποΑ-I και κατά 62% στα επίπεδα της HDL (17 αντί 47 mg/dl, αντιστοίχως). Η μέση FMD βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε φορείς της μετάλλαξης για την αποΑ-I(Leu178Pro), ενώ η καροτιδική IMT ήταν αυξημένη σε παρόμοιο βαθμό με την αύξηση που παρουσιάζουν ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία και υψηλά επίπεδα LDL-χοληστερόλης. Φορείς της μετάλλαξης για την αποΑ-I(Leu178Pro) παρουσίαζαν 24 φορές αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο (Hovingh et al. 2004).

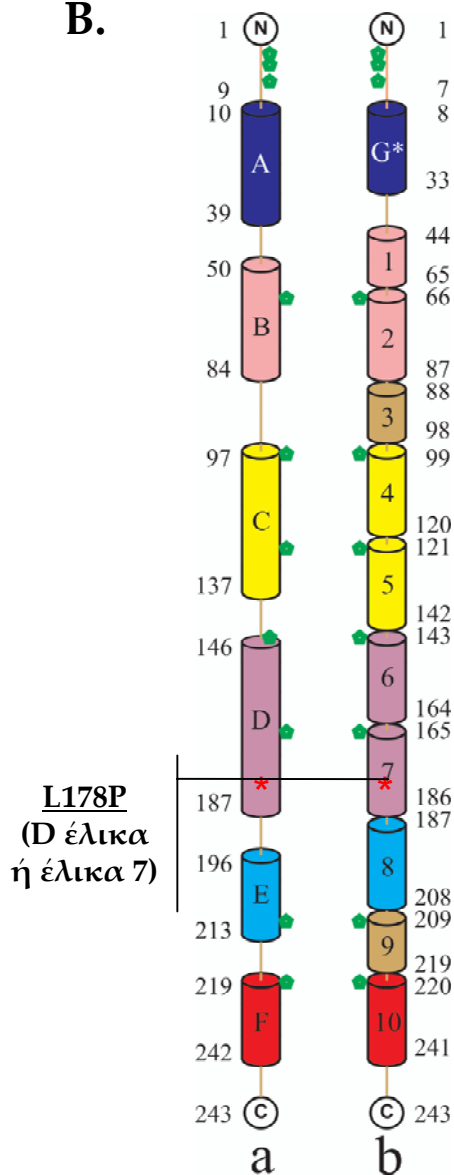


## αποΑ-I(Leu178Pro)

**A.**



**B.**



### Κλινική εικόνα των φορέων

- Μείωση της αποΑ-I σε ετεροζυγώτες κατά 50%, έλλειψης της αποΑ-I(Leu178Pro) από το πλάσμα τους.
- Μείωση της HDL-χοληστερόλης κατά 62%
- Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου
- 24 φορές αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου

**Εικόνα 17.** Σχηματική απεικόνιση της μετάλλαξης αποΑ-I(Leu178Pro) και περιγραφή της κλινικής εικόνας των ασθενών-φορέων της μετάλλαξης. Α. Η αμινοξική αντικατάσταση, Β. Η θέση της μετάλλαξης στη δομή της αποΑ-I όπως προβλέπεται από την(a) κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (Ajees et al. 2006) και (b) από την δευτεροταγή της δομή (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999).

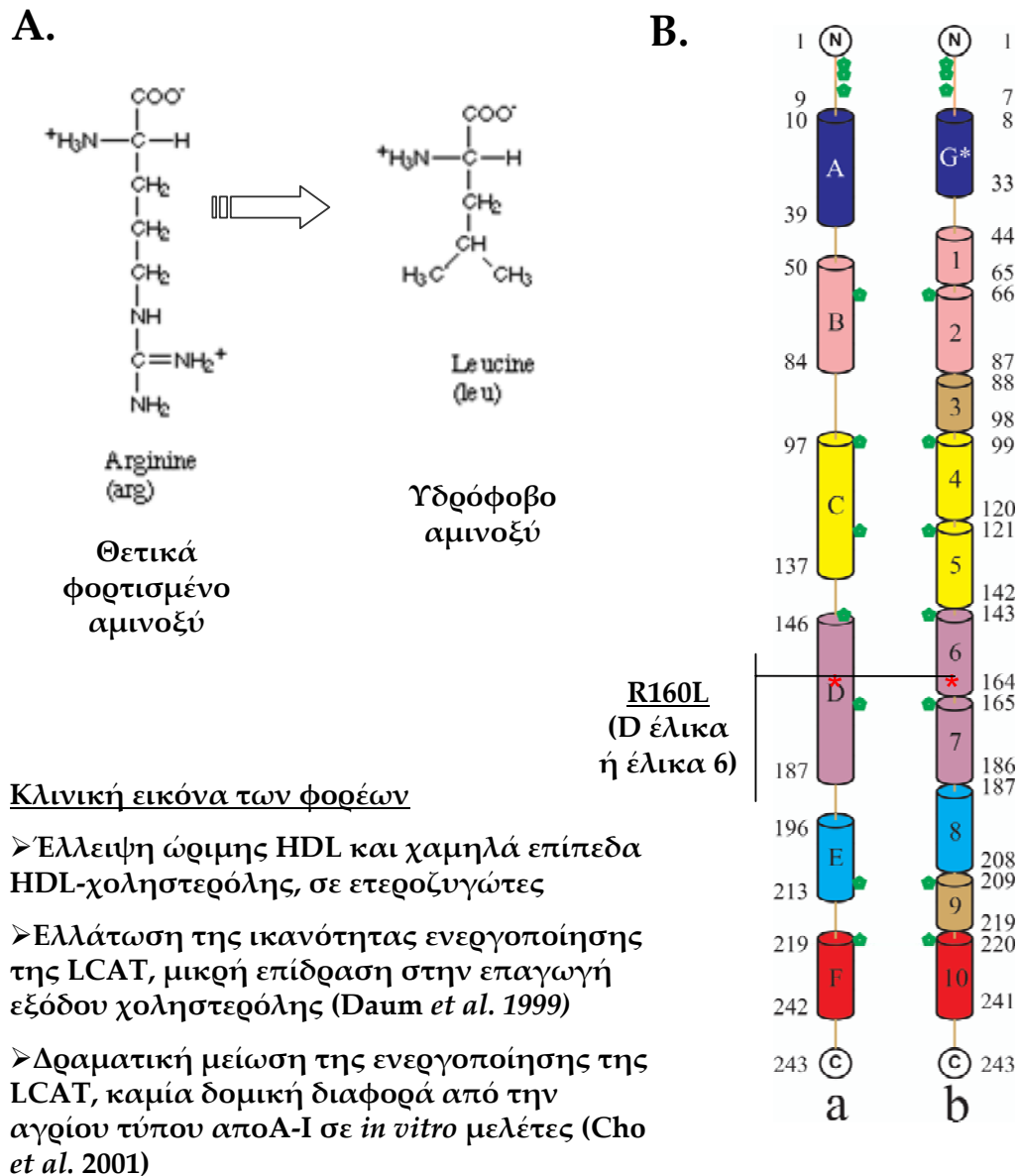
Είναι φανερό ότι είναι αναγκαία η μελέτη των αλληλεπιδράσεων της αποA-I(Leu178Pro) *in vivo* σε σύστημα ελεύθερο από αγρίου τύπου αποA-I [π.χ. ποντίκια ελλειμματικά για την αποA-I του ποντικού που να είναι ομόζυγα ως προς την αποA-I(Leu178Pro) του ανθρώπου] ώστε να εξακριβωθεί σε ποιο στάδιο και με ποιό τρόπο αυτή η μεταλλαγμένη μορφή επηρεάζει την βιογένεση της HDL, κάτι που είναι αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

### **Η αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>**

Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση του θετικά φορτισμένου αμινοξέος Αργινίνη (Arg) από το υδρόφοβο αμινοξύ Λευκίνη (Leu), στην θέση 160 της αποA-I. Η θέση του αμινοξέος αυτού τοποθετεί στην έλικα 6, με βάση την δομή που έχει προταθεί από την αλληλουχία της αποA-I (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999) ή στην έλικα D, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή όπως αυτή αναλύθηκε από τους Ajees et al. (Ajees et al. 2006) (**Εικόνα 18**).

Το 1997, ο Leren και οι συνεργάτες του μελέτησαν τέσσερα μέλη μιας οικογένειας οκτώ ατόμων τα οποία βρέθηκαν να είναι ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη για την αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>. Οι φορείς της μετάλλαξης εμφάνιζαν 67% μειωμένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης, 56% μειωμένα επίπεδα αποA-I και 70% μειωμένα επίπεδα αποA-II, σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας (control) (Leren et al. 1997). Η ικανότητα του πλάσματος να εστεροποιεί χοληστερόλη ήταν 30% μειωμένη στους ετεροζυγώτες (Leren et al. 1997) γεγονός που δείχνει μειωμένη ενεργότητα της LCAT. Ανάλυση του

## αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>



**Εικόνα 18.** Σχηματική απεικόνιση της μετάλλαξης αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και περιγραφή της κλινικής εικόνας των ασθενών-φορέων της μετάλλαξης. A. Η αμινοξική αντικατάσταση, B. Η θέση της μετάλλαξης στη δομή της αποA-I όπως προβλέπεται από την (a) κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (Ajees *et al.* 2006) και (b) από την δευτεροταγή της δομή (Borhani *et al.* 1997; Borhani *et al.* 1999).

πλάσματος σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων έδειξε έλλειψη των α-κινητικότητας σωματιδίων μεγάλου μεγέθους (Leren et al. 1997), που αντιστοιχούν στα σωματίδια α1 και α2 της HDL

Οι Daum et al. μελέτησαν τις ιδιότητες της αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslø</sub>, in vitro. Σε σύγκριση με την αγρίου τύπου αποA-I, η ελεύθερη-λιπιδίων αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslø</sub> ήταν εξίσου αποτελεσματική στο να επάγει έξοδο χοληστερόλης από μακροφάγα κύτταρα του ποντικού (murine peritoneal macrophages) (Daum et al. 1999b).

Σε πειράματα-δοκιμές διαλυτοποίησης μυκωλίων [dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)-solubilization assays], τα οποία μετράνε την ικανότητα αλληλεπίδρασης και δέσμευσης των πρωτεϊνών με λιπίδια, η πρωτεΐνη αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslø</sub> εμφάνισε μειωμένη δραστηριότητα, σε σχέση με την αγρίου τύπου αποA-I (Daum et al. 1999b). Άλλοι ερευνητές όμως παρουσίασαν δεδομένα που δεν δείχνουν διαφορές μεταξύ των δύο μορφών (Cho et al. 2001). Επιπροσθέτως, η διπλή μεταλλαγμένη μορφή Arg153Gln/Arg160Gln της αποA-I μελετήθηκε από άλλους ερευνητές και δεν βρέθηκε επίδραση των μεταλλάξεων στην ικανότητα διαλυτοποίησης μυκωλίων από την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (Roosbeek et al. 2001).

Η ικανότητα σωματιδίων rHDL με την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT βρέθηκε μειωμένη κατά 29%, σε σύγκριση με αυτή της αγρίου τύπου αποA-I (Daum et al. 1999b). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η ικανότητα ενεργοποίησης της LCAT από την αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslø</sub> ήταν μειωμένη στο 0.6% λόγω αύξησης κατά 11 φορές της φαινομενικής  $K_m$  και μείωσης κατά 13 φορές της φαινομενικής  $V_{max}$ .

Ανάλυση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslø</sub> μέσω κυκλικού διχροϊσμού (circular dichroism) και φασματομετρίας φθορισμού (fluorescence

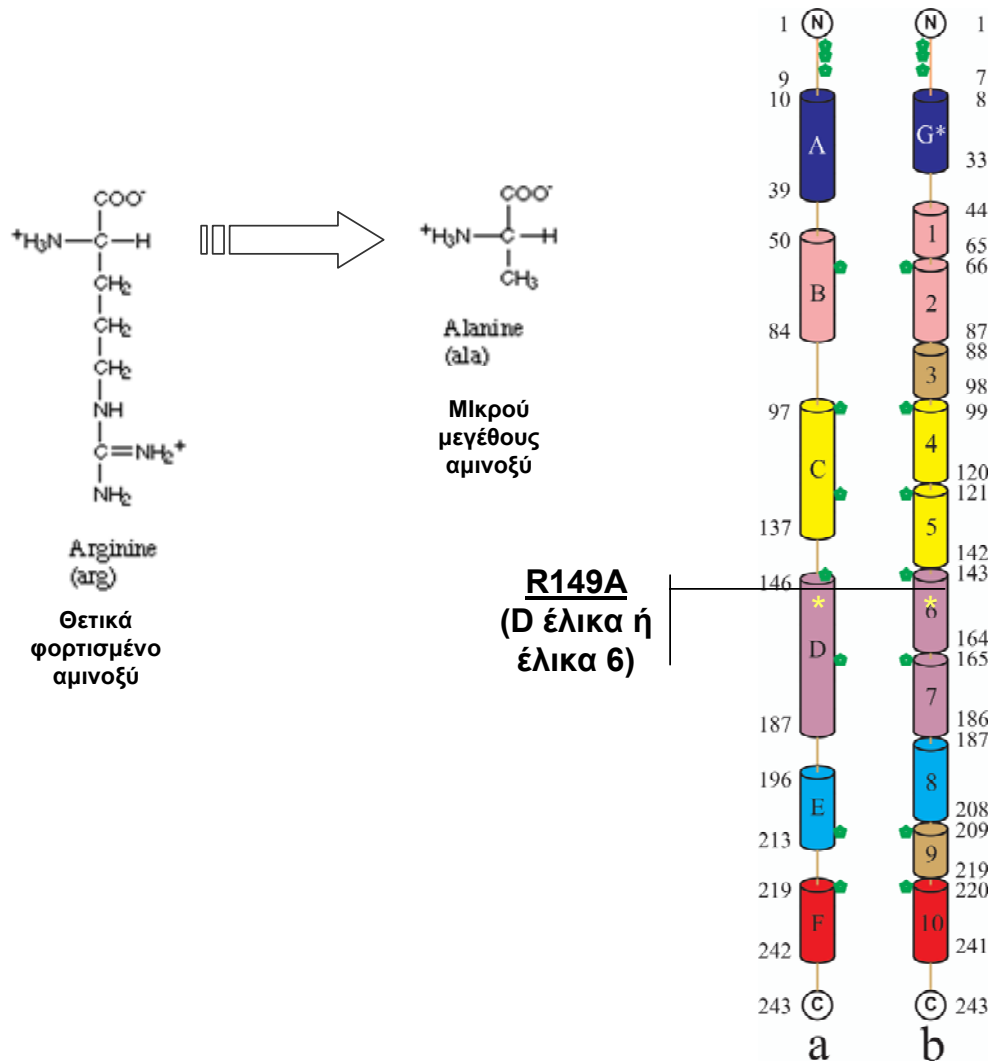
spectrometry) δεν ανίχνευσε αλλαγή στην περιεκτικότητα του μορίου σε  $\alpha$ -έλικες (Cho et al. 2001), γεγονός που υποδεικνύει ότι η μετάλλαξη αυτή δεν επηρεάζει την δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης.

### **Η τεχνητή μεταλλαγμένη μορφή αποA-I(Arg149Ala)**

Με σκοπό να μελετηθεί *in vivo* και σε λεπτομέρεια η περιοχή 143-164 της αποA-I, κατασκευάστηκε και μελετήθηκε η μετάλλαξη που παράγει την τεχνητή (bioengineered) μεταλλαγμένη μορφή αποA-I(Arg149Ala). Πρόκειται για αντικατάσταση του θετικά φορτισμένου αμινοξέως αργινίνη (Arg) στη θέση 149 από το μικρού μεγέθους αμινοξύ αλανίνη (Ala). Η θέση του αμινοξέως αυτού το τοποθετεί στην αρχή της έλικας 6, με βάση την δομή που έχει προταθεί από την αλληλουχία της αποA-I (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999), ή της έλικας D, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή όπως αυτή αναλύθηκε από τους Ajees et al. (**Εικόνα 19**) (Ajees et al. 2006).

Ο Roosbeek και οι συνεργάτες του, μελέτησαν συγκεκριμένα πολικά αμινοξέα στην αλληλουχία της αποA-I που φαίνονται να είναι συντηρημένα μεταξύ των διαφόρων ειδών. Βρήκαν ότι η περιοχή των αμινοξέων 143-164 της αποA-I, περιέχει τρία ιδιαίτερα συντηρημένα αμινοξέα αργινίνης, τα Arg149, Arg153, και Arg160, τα οποία σχηματίζουν το μόνο σημαντικό θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό στο μόριο της πρωτεΐνης. Μεταλλάξεις στα αμινοξέα αυτά δεν άλλαξαν την δομή του μορίου, αλλά μείωσαν δραστικά την ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να ενεργοποιεί το ενζύμου LCAT, *in vitro* (Roosbeek et al. 2001). Η σημαντική μείωση στην ενεργότητα των μεταλλαγμάτων αυτών προέρχεται από μείωση της μέγιστης φαινομενικής

## Τεχνητή μετάλλαξη αποA-I(Arg149Ala)

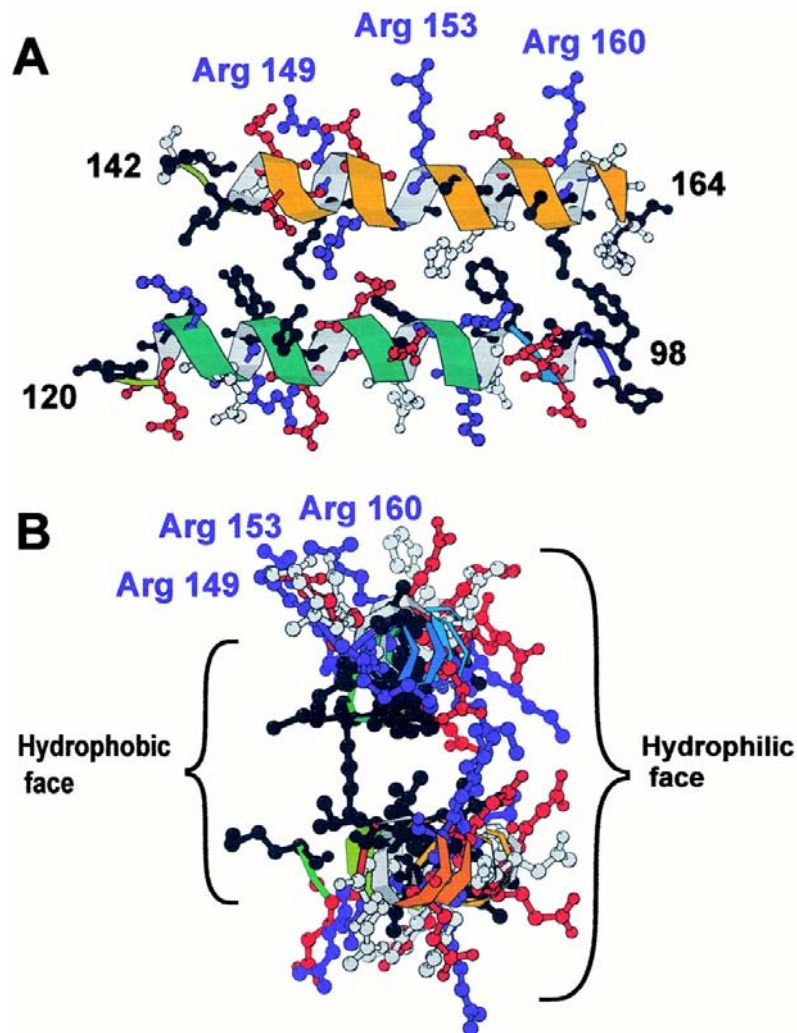


**Εικόνα 19.** Σχηματική απεικόνιση της τεχνητής (bioengineered) μετάλλαξης αποA-I(Arg149Ala). Α. Η αμινοξική αντικατάσταση, Β. Η θέση της μετάλλαξης στη δομή της αποA-I όπως προβλέπεται από την (a) κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (Ajees et al. 2006) και (b) από την δευτεροταγή της δομή (Borhani et al. 1997; Borhani et al. 1999).

ταχύτητας της αντίδρασης ( $V_{\max_{app}}$ ) της αποΑ-I με την LCAT, ενώ η φαινομενική σταθερά συνάφειας ( $K_{m_{app}}$ ) παρέμεινε ίδια με αυτή του αγρίου τύπου αποΑ-I.

Οι Jonas et al. πρότειναν ότι η LCAT συνδέεται με την επάνω επιφάνεια του δισκοειδούς σωματιδίου της HDL και ότι η αλληλεπίδραση αυτή περιλαμβάνει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με λιπίδια και/ή πολικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης LCAT με την αποΑ-I (Jonas 1998). Συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της LCAT και της αποΑ-I μπορεί να προκαλούν δομικές αλλαγές στην LCAT, οι οποίες είναι αναγκαίες για την πλήρη ενεργοποίηση της δράσης της. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι ηλεκτροστατικές δεδομένου ότι και η δράση της LCAT επηρεάζεται από αυξάνομενες συγκεντρώσεις άλατος (Jonas et al. 1986). Σε αυτή την περίπτωση, προτείνεται ότι, τα αμινοξέα αργινίνης στις θέσεις 149, 153 και 160 της αποΑ-I μπορεί να σχηματίζουν δεσμούς άλατος με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα της LCAT, ή υδρογονικούς δεσμούς με άλλα πολικά κατάλοιπα του ενζύμου (Roosbeek et al. 2001). Τα αμινοξέα Arg149, Arg153, και Arg160 της αποΑ-I βρίσκονται στο όριο της υδρόφοβης/υδρόφιλης επιφάνειας της αμφιπαθικής έλικας της αποΑ-I (**Εικόνα 20**), που τοποθετεί τις πλάγιες ομάδες τους στην σωστή θέση για να αλληλεπιδράσουν με μόρια της LCAT προσδεδεμένα στην επιφάνεια του δισκοειδούς σωματιδίου (Roosbeek et al. 2001).

Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν στο ότι τα αμινοξέα αυτά συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της LCAT από την αποΑ-I και επίσης υποστηρίζουν το μοντέλο «ζώνης» (belt model) για την δισκοειδή HDL μιας και κατά το μοντέλο αυτό τα αμινοξέα αυτά δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμών άλατος με το αντι-παράλληλο μόριο αποΑ-I αλλά «βλέπουν» προς την εξωτερική επιφάνεια του δίσκου, επιτρέποντας πιθανές



**Εικόνα 20.** Σχηματική απεικόνιση της έλικας 6 (αμινοξέα 143–164) της apoA-I, μαζί με την συμπληρωματική έλικα (αμινοξέα 99-120) του αντιπαράλληλου μορίου apoA-I, σε ένα διμερές της ελλειματικής μορφής Δ(1-43) της apoA-I. (A) σε παράλληλη διάταξη και (B) σε κάθετη όψη κατά τον άξονα της έλικας (Roosbeek et al. 2001).



αλληλεπιδράσεις με την LCAT (Roosbeek et al. 2001).

Μελέτες σε μοντέλα ζώων με μεταλλάξεις της αποΑ-I στα αμινοξέα αργινίνη 160 και ιστιδίνη 162 έδειξε ότι αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές προκαλούν δραματική μείωση στα επίπεδα της HDL και της αποΑ-I στο πλάσμα, ενώ δεν επιτρέπουν το σχηματισμό σφαιρικών σωματιδίων HDL, αλλά συσσώρευση δισκοειδών σωματιδίων, μια εικόνα παρόμοια με αυτή ασθενών με έλλειψη του ενζύμου LCAT. Συν-έκφραση των μεταλλάξεων με υπερέκφραση του ενζύμου LCAT του ανθρώπου, αποκατέστησε τον φαινότυπο και επέτρεψε το σχηματισμό σφαιρικών σωματιδίων στο πλάσμα (Chroni et al. 2005a). Επίσης, άλλες μελέτες χρησιμοποιώντας ελλειματικές μορφές της αποΑ-I στην περιοχή της έλικας 6, έχουν δείξει τον σημαντικό ρόλο της περιοχής αυτής στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από την αποΑ-I (McManus et al. 2000).

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ΥΛΙΚΑ

Τα ένζυμα περιορισμού (ενδονουκλεάσες), τα ρυθμιστικά τους διαλύματα και οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των πλασμιδίων, αγοράστηκαν από την New England Biolabs. Τα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) αγοράστηκαν από την Promega, ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάστηκαν από την Invitrogen. Για την κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1 της Invitrogen. Ο δείκτης μοριακού βάρους “1 kb DNA Ladder” για DNA αγοράστηκε από την New England Biolabs. Το θρεπτικά υλικό κατά Luria Bertani (LB) με ή χωρίς άγαρ που χρησιμοποιήθηκε για τις υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων, αντίστοιχα, αγοράστηκε από την American Bioanalytical. Η αγαρόζη (Ultrapure Agarose<sup>®</sup>) αγοράστηκε από την Invitrogen, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα χημικά των εταιρειών Fisher Scientific και Sigma. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα από βακτηριακή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το High Purity Plasmid Maxiprep System της Marligen Biosciences, Inc.. Για την απομόνωση και καθαρισμό τμημάτων DNA μεγέθους έως 10kb από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Rapid Gel Extraction System της Marligen Biosciences, Inc., ενώ για μεγαλύτερου μεγέθους πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε το QIAEX II Gel Extraction kit της Qiagen. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Hybond αγοράστηκαν από την εταιρεία Amersham Biosciences, ενώ μεμβράνες πολυαμιδίου (nylon) Immobilon<sup>™</sup>-P PVDF (polyvinylidene fluoride) αγοράστηκαν από την Millipore. Για την ανίχνευση πρωτεϊνών κατά Western, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) της εταιρείας

Amersham Pharmacia Biotech και το SuperSignal<sup>®</sup> West Pico της Pierce. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες κυτταρικών σειρών και συγκεκριμένα τα θρεπτικά υλικά Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) και Leibovitz's L-15 Medium (L-15), το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS), το ένζυμο Trypsin-EDTA καθώς και τα αντιβιοτικά Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη αγοράστηκαν από την Cellgro, ενώ ο ορός Fetal Bovine Serum (FBS) από την Biomeda. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης με κλίση συγκέντρωσης 4-20% Tris-HCl, IPG COMB αγοράστηκαν από την BIO-RAD. Για την ραδιενεργό επισήμανση των ανιχνευτών (probes) χρησιμοποιήθηκε το Rediprime II Random Prime Labelling System και τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια Redivue [<sup>32</sup>P]dCTP της Amersham Biosciences. Η στήλη μοριακής διήθησης Superose 6 PC 3.2/30 και οι στήλες ιοντοανταλλαγής "HiTrap Q FF" αγοράστηκαν από την General Electric. Salmon sperm DNA (10mg/ml) και 50X Denhardt's Solution αγοράστηκαν από την Invitrogen. Για τις αναλύσεις Northern και Western χρησιμοποιήθηκαν films BioMax MS της KODAK. Τα υπόλοιπα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από κοινές εμπορικές πηγές στη μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### ***Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αραρόζης (agarose gel)***

Για τις ηλεκτροφορήσεις νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αραρόζης 1% έως 0.5% (παρασκευαστικό gel). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής : Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 120ml TAE 1x (50x TAE: 2M Tris-HCl pH 7.5,

2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1 gr αγαρόζης. Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν η θερμοκρασία του υποχωρήσει στους 50°C προστίθενται 7.5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) και το μείγμα εκχύνεται σε κατάλληλο εκμαγείο, ενώ τοποθετούνται και τα εκμαγεία των πηγαδιών φόρτωσης των δειγμάτων. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1x TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα-φορέα της ηλεκτροφόρησης. Συνήθως η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 80 Volt (V), ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό πήκτωμα γίνεται στα 50 V μέχρι επαρκούς ανάλυσης των δειγμάτων.

#### ***Αντίδραση με ένζυμο περιορισμού (πέψη)***

Τα πλασμίδια και τα προϊόντα των PCRs που χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποιήσεις, επωάστηκαν με ενδονουκλεάσες (ένζυμο περιορισμού) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επί το πλείστον, οι επωάσεις έγιναν με 15 μg νουκλεϊκών οξέων, στους 37°C, για 2.5 ώρες.

#### ***Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)***

Οι αντιδράσεις σύνδεσης DNA έγιναν σε θερμοκρασία 16°C, για 16 ώρες, σε τελικό όγκο 10 μl ή 20 μl. Η ποσότητα DNA κυμαινόταν συνολικά στα 200 ng. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, ένζυμο T4 DNA ligase και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα της κατασκευάστριας εταιρίας (Invitrogen).

### ***Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων E.coli DH5a***

Σε βακτηριολογικό σωλήνα φέρονται 100 μl βακτηριακών κυττάρων DH5a (competent cells, κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν) και ποσότητα 10 μl της αντίδρασης σύνδεσης ή 20-100 ng του πλασμιδίου που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, υφίσταται θερμικό shock στους 42<sup>0</sup>C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθενται 500-900 μl θρεπτικού LB και επωάζεται η καλλιέργεια υπό ανάδευση στους 37<sup>0</sup>C για 1-2 ώρες. 100 μl καλλιέργειας απλώνονται με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου σε τρυβλίο στερεού θρεπτικού μέσου (LB-αγαρ) που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 16-18 ώρες.

### ***Κυτταροκαλλιέργειες***

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HTB-13 (SW1783, αστροκύτταρα ανθρώπου), 911 (human embryonic retinoblasts), και HEK-293 (human embryonic kidney). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα μακροφάγα κύτταρα ποντικού J774. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 ή 175 cm<sup>2</sup> και σε τρυβλία 6-well, και p-100 (διαμέτρου 6 και 100 mm, αντίστοιχα), σε επωαστήρα θερμοκρασίας 37<sup>0</sup>C και σε συνθήκες 5% CO<sub>2</sub>. Αποθέματα καλλιιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε υπερκαταψύκτη στους -80<sup>0</sup>C σε θρεπτικό μέσο DMEM (ή Leibovitz's L-15) με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο 37 °C ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα. Το θρεπτικό μέσο στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 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 DMEM (ή Leibovitz's L-15) συμπληρωμένο με 10% FBS και 1% αντιβιοτικών (συνήθως τελική αραίωση στις φλάσκες 1:10).

***Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)***

Σε κάθε δείγμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το 4X SDS Loading Buffer [2.5 ml 1M Tris-HCl pH 8, 1.6 ml β-mercaptoethanol, 8 ml 20% SDS, 4 ml glycerol, 8 mg bromophenol blue]. Χρησιμοποιήθηκαν πήκτώματα πολυακρυλαμίδης 14% για το πήκτωμα διαχωρισμού (Running gel) [2.2 ml ddH<sub>2</sub>O, 3.5 ml 30% bis-acrylamide, 1.8 ml running buffer (Tris-HCl 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8), 37 μl 10% υπερθειικό αμμώνιο (APS), 5 μl TEMED] και 4% για το πήκτωμα πακεταρίσματος (Stacking gel) [1,8 ml ddH<sub>2</sub>O, 0.45 ml 30% acrylamide, 0.75 ml stacking buffer (0.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 6.8), 30 μl 10% APS, 3 μl TEMED]. Οι ηλεκτροφορήσεις έγιναν σε 500 ml διαλύματος 1x TGS [1L 10x TGS : 30.2 gr Tris-HCl, 144 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3], στα 120 V και με χρήση της συσκευής Bio-Rad Protean electroblot.

Χρώση (staining) και σταθεροποίηση (fixing) των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με επώαση των πήκτωμάτων σε διάλυμα χρώσης [2.5 g Coomassie Brilliant Blue R, 50% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος] για 30 λεπτά, ακολουθούμενη από επώαση σε διάλυμα έκπλυσης [50% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος] για άλλα 20 λεπτά και για όσο χρειάστηκε μέχρι ικανοποιητικής εικόνας χρώσης των πρωτεϊνικών ζωνών.

Τα πήκτώματα υπέστησαν ξήρανση σε συσκευή ξήρανσης, υπό κενό, στους 80°C για 1 ώρα.

### *Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης κατά Western*

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και έπειτα από SDS-PAGE ανάλυση, σε nylon μεμβράνες PVDF. Τα πηκτώματα χρησιμοποιούνται μετά την ηλεκτροφόρηση και χωρίς να ακολουθήσει χρώση. Πριν την μεταφορά οι μεμβράνες επωάζονται με τη σειρά σε μεθανόλη, νερό και τέλος σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) [700 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml 10x TGS και 200 ml μεθανόλης], σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η μεταφορά έγινε σε συσκευή Bio-Rad Protean electroblot σε 1 L διαλύματος μεταφοράς (Transfer Buffer) με ηλεκτροφόρηση στα 40 V, στους 4°C για 16 ώρες.

Μετά την περάτωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών, η μεμβράνη εκπλένεται σε μεθανόλη. Μια πρώτη εικόνα των πρωτεϊνών φαίνεται με χρώση της μεμβράνης με χρωστική Ponceau, έκπλυση 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.

Μετά την χρώση, ακολουθεί έκπλυση των μεμβρανών με διάλυμα blocking buffer [1x TBS-T, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα] 3 φορές επί 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C με blocking buffer στο οποίο έχει αραιωθεί το πρωτεΐν αντισώμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή πρωτεΐνη, σε αραιώση συνήθως 1:2000. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται για 3 φορές επί 10 λεπτά με διάλυμα TBS-T, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών με κατάλληλο, σε αραιώση συνήθως 1:4000, δευτερεύον αντισώμα το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντισώμα και φέρει συνδεδεμένο το ένζυμο horse radish peroxidase (HRP), γίνεται για 1 ώρα, στους 37°C. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T, και μία έκπλυση με 1x TBS για 5 λεπτά,



σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και εκθέτοντας τις μεμβράνες φιλμ για διάφορα χρονικά διαστήματα (συνήθως 30 sec με 2 min ήταν αρκετά).

### ***Δημιουργία του πλασμιδίου “pCDNA3.1-apoA1g-ΔBglII”***

Χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο “pUC19-apoA1g” (Roghani and Zannis 1988) που φέρει την γενωμική αλληλουχία της αγρίου τύπου (WT) apoA-I, μεγέθους 2.2 kb. Η γενωμική αλληλουχία της apoA-I που φέρει το πλασμίδιο “pUC19-apoA1g”, είναι η ακόλουθη και βρίσκεται μεταξύ αλληλουχιών αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου PstI που φαίνονται υπογραμμισμένες:

```
1  CTGCAGACAT AAATAGGCC TCAAGAGCT GGCTGCTTAG AGACTGCGAG AAGGAGGTGC
61  GTCCTGCTGC CTGCCCCGGT CACTCTGGCT CCCCAGCTCA AGGTCAGGC CTGCCCCAG
121  GCCGGGCCTC TGGGTACCTG AGGTCTTCTC CCGCTCTGTG CCCTTCTCCT CACCTGGCTG
181  CAATGAGTGG GGGAGCACGG GGCTTCTGCA TGCTGAAGGC ACCCCACTCA GCCAGGCCCT
241  TCTTCTCCTC CAGGTCCCCC ACGGCCCTTC AGGATGAAAG CTGCGGTGCT GACCTTGGCC
301  GTGCTCTTCC TGACGGGTAG GTGTCCCCTA ACCTAGGGAG CCAACCATCG GGGGGCTTTC
361  TCCCTAAATC CCCGTGGCCC ACCCTCCTGG GCAGAGGCAG CAGGTTTCTC ACTGGCCCCC
421  TCTCCCCCAC CTCCAAGCTT GGCCTTTCGG CTCAGATCTC AGCCACAGC TGGCCTGATC
481  TGGGTCTCCC CTCCCACCT CAGGGAGCCA GGCTCGGCAT TTCTGGCAGC AAGATGAACC
541  CCCCAGAGC CCCTGGGATC GAGTGAAGGA CCTGGCCACT GTGTACGTGG ATGTGCTCAA
601  AGACAGCGGC AGAGACTATG TGTCCAGTT TGAAGGCTCC GCCTTGGGAA AACAGCTAAA
661  GTAAGGACCC AGCCTGGGGT TGAGGGCAGG GGCAGGGGGC AGAGGCCTGT GGGATGATGT
721  TGAAGCCAGA CTGGCCGAGT CCTCACCTAA TATCTGATGA GCTGGGCCCC ACAGATGGTC
781  TGGATGGAGA AACCGBAATG GGATCTCCAG GCAGGGTCAC AGCCCATGTC CCCTGCAAAG
841  GACAGACCAG GGCTGCCCGA TCGTGATCA CAGAGCCACA TTGTGCCTGC AAGTGTAGCA
901  AGCCCCTTTC CCTTCTTAC CACCTCCTCT GCTCCTGCCC AGCAAGACTG TGGGCTGTCT
961  TCGGAGAGGA GAATGCGCTG GAGGCATAGA AGCGAGGTCC TTCAAGGGCC CACTTTGGAG
1021  ACCAACGTAA CTGGGCACTA GTCCCAGCTC TGTCTCCTTT TTAGCTCCTC TCTGTGCCTC
```

1081 GGTCCAGCTG CACAACGGGG CATGGCCTGG CGGGGCAGGG GTGTTGGTTG AGAGTGTACT  
 1141 GGAAATGCTA GGCCACTGCA CCTCCGCGGA CAGGTGTCAC CCAGGGCTCA CCCCTGATAG  
 1201 GCTGGGGCGC TGGGAGGCCA GCCCTCAACC CTTCTGTCTC ACCCTCCAGC CTAAAGCTCC  
 1261 TTGACAACTG GGACAGCGTG ACCTCCACCT TCAGCAAGCT GCGCGAACAG CTCGGCCCTG  
 1321 TGACCCAGGA GTTCTGGGAT AACCTGGAAA AGGAGACAGA GGGCCTGAGG CAGGAGATGA  
 1381 GCAAGGATCT GGAGGAGGTG AAGGCCAAGG TGCAGCCCTA CCTGGACGAC TTCCAGAAGA  
 1441 AGTGGCAGGA GGAGATGGAG CTCTACCGCC AGAAGGTGGA GCCGCTGCGC GCAGAGCTCC  
 1501 AAGAGGGCGC GCGCCAGAAG CTGCACGAGC TGCAAGAGAA GCTGAGCCCA CTGGGCGAGG  
 1561 AGATGCGCGA CCGCGCGCGC GCCCATGTGG ACGCGCTGCG CACGCATCTG GCCCCCTACA  
 1621 GCGACGAGCT GCGCCAGCGC TTGGCCGCGC GCCTTGAGGC TCTCAAGGAG AACGGCGGCG  
 1681 CCAGACTGGC CGAGTACCAC GCCAAGGCCA CCGAGCATCT GAGCACGCTC AGCGAGAAGG  
 1741 CCAAGCCCGC GCTCGAGGAC CTCCGCCAAG GCCTGCTGCC CGTGCTGGAG AGCTTCAAGG  
 1801 TCAGCTTCCT GAGCGCTCTC GAGGAGTACA CTAAGAAGCT CAACACCCAG TGAGGCGCCC  
 1861 GCCGCCGCC CCCTTCCCGG TGCTCAGAAT AAACGTTTCC AAAGTGGGAA GCAGCTTCTT  
 1921 TCTTTTGGGA GAATAGAGGG GGGTGCGGGG ACATCCGGGG GAGCCCGGGT GGGGCCTTTG  
 1981 GCCCTGGAGC AGGGACTTCC TGCCGGATCT CAACAACCTCC GTGCCCAGAC AGGACGTCTT  
 2041 AGGGCCAAGA TCGACGTTGG AGGACCTGCT GGACGCCTGG CTGCTTACGA GTGAGGGAGT  
 2101 AGAGTCTGCC TTAGCAAGGC TCAAGTAGAA AGGAAGTCAC AGCGGACCAG GCAAAGCCAC  
 2161 AGACAATCCA AGGCCAGGTG CCCTGAAAGG GGCTCAAACA AGGCCTGCAG

Το πλασμίδιο “pUC19-αροA1g” επώαστηκε με το ένζυμο περιορισμού BglIII και στη συνέχεια με την υπομονάδα Klenow της DNA πολυμεράσης I με σκοπό να συμπληρωθεί η αλληλουχία (fill in) στο εσωτερικό 3’ άκρο (recessive 3’). Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης (ligation) που οδήγησε σε απώλεια της αλληλουχίας αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BglIII (5’-AGATCT-3’) που φυσιολογικά υπάρχει στην θέση 181 της γενωμικής αλληλουχίας της αποA-I (διπλά υπογραμμισμένη), σε σχέση με το κωδικόνιο έναρξης ATG, που φαίνεται με έντονα γράμματα. Πρέπει να επισημανθεί ότι η θέση αναγνώρισης του BglIII βρίσκεται σε αλληλουχία ιντρονίου (intron) και δεν αλλάζει την αλληλουχία κωδικοποίησης της αποA-I.

Το πλασμίδιο το οποίο προέκυψε, ονομάστηκε “pUC19-apoAIg(ΔBglII)”, και χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα (template) για τον πολλαπλασιασμό (amplification) μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), της γενωμικής (genomic) αλληλουχίας της απολιποπρωτεΐνης A-I (apoA-I). Για την PCR χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι ολιγονουκλεοτιδίων εκκίνησης (primers) που αντιστοιχεί στα άκρα της αλληλουχίας της apoA-I, ονομαστικά ο 5’ εκκινήτης “apoAIg F” με αλληλουχία : 5’-GCT CTA GAT CTG ACA TAA ATA GGC CCT GC-3’ και ο 3’ “apoAIg R” με αλληλουχία 5’-GCG GAT ATC CAG GCC TTG TTT GAG CC-3’. Ο “apoAIg F” σχεδιάστηκε ώστε να φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα XbaI (5’- TCTAGA -3’) και BglII (5’- AGATCT -3’) ενώ ο “apoAIg R” φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο EcoRV (5’- GATATC -3’), τοποθετώντας έτσι τις αλληλουχίες αυτές στα 5’ και 3’ άκρα, αντίστοιχα, του γονιδίου της apoA-I. Η PCR έγινε σε Paltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research) και σύμφωνα με το εξής πρόγραμμα:

94°C για 2 λεπτά

94°C για 30 δευτερόλεπτα

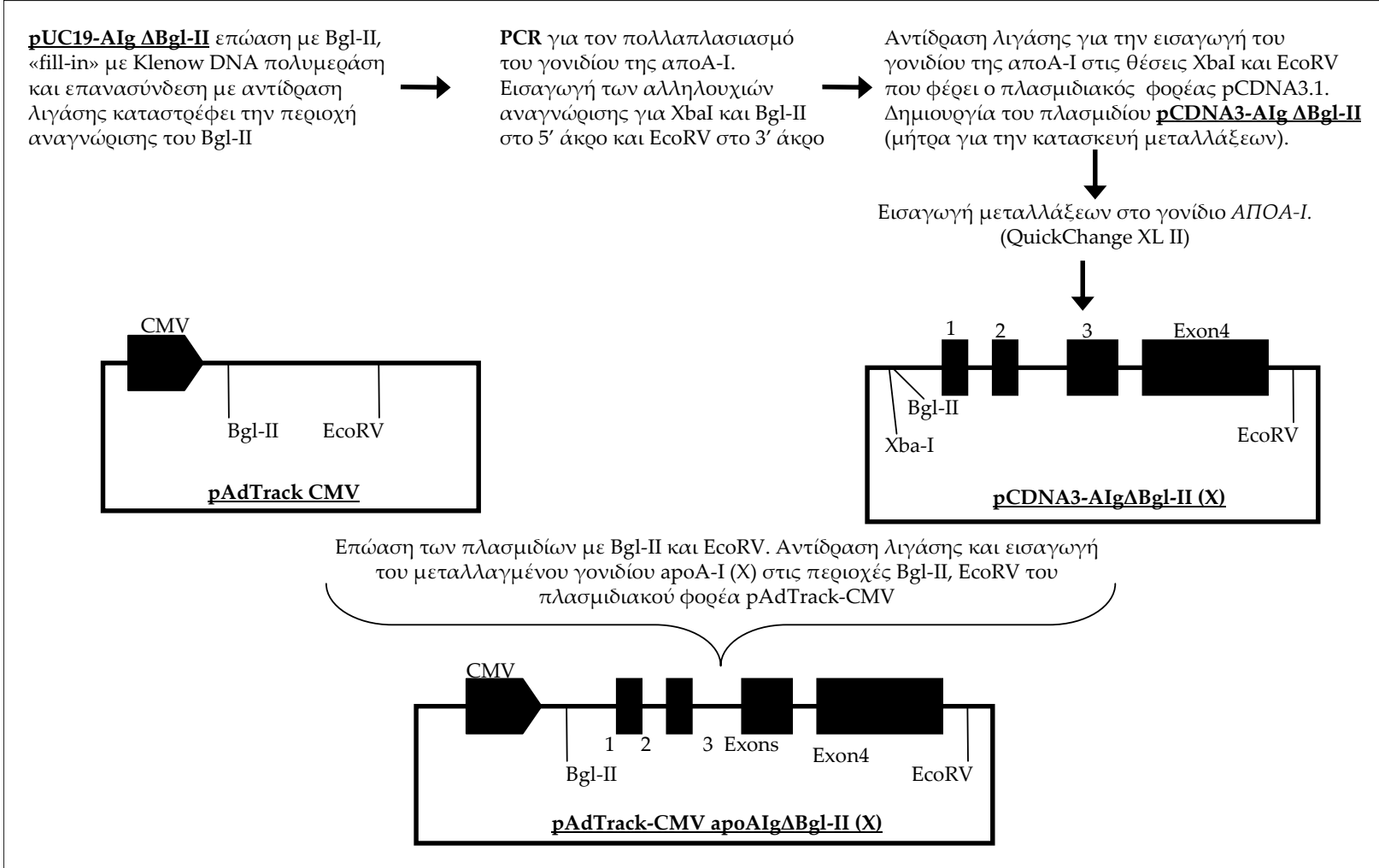
65°C για 2.5 λεπτά

72°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 5 λεπτά

} 28 επαναλήψεις

Το προϊόν της PCR μεταφέρθηκε στον πλασμιδιακό φορέα (vector) “pCDNA3.1(+)” σχηματίζοντας έτσι το πλασμίδιο “pCDNA3.1-apoAIg-ΔBglII” (**Εικόνα 21**).



**Εικόνα 21.** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας κατασκευής των πλασμιδίων για την μεταλλαξιγένεση του γονιδίου της apoA-I και την δημιουργία των ανασυνδυασμένων αδενοϊών (όπου X: η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης).

### ***Δημιουργία των μεταλλάξεων στο γονίδιο της αποΑ-I***

Το πλασμίδιο “pCDNA3.1-apoAIg-ΔBglII” χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα (template) για την κατασκευή των μεταλλάξεων του γονιδίου της αποΑ-I που θέλησα να μελετήσω στην παρούσα εργασία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα QuikChange<sup>®</sup> II XL της Stratagene. Το πλασμίδιο-μήτρα επώαστηκε με κατάλληλους εκκινητές που αντιστοιχούν την περιοχή του γονιδίου που εντοπίζεται η μετάλλαξη που επιλέξαμε. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν στο κέντρο της αλληλουχίας τους την μετάλλαξη, ενώ εκατέρωθεν παρέμεινε η αγρίου τύπου αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Η μετάλλαξη έγινε με βάση την αλλαγή των αμινοξέων την τελική πρωτεϊνική αλληλουχία και κατά συνέπεια, χρειάστηκε σε μία περίπτωση να αλλαχθούν περισσότερα του ενός νουκλεοτιδίου της αγρίου τύπου αλληλουχίας (βλ. εκκινητές R149A στον **Πίνακα II**). Τα νουκλεοτίδια που αντικατέστησαν τα αγρίου τύπου νουκλεοτίδια, για να προκληθεί η μετάλλαξη, επιλέχθηκαν με βάση την συχνότητα χρήσης στον άνθρωπο του κάθε κωδικωνίου για το αντίστοιχο αμινοξύ (codon usage).

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μετάλλαξη φαίνονται στον **Πίνακα II** με το όνομά τους να αντιστοιχεί στην μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-I που προκαλούν. Για παράδειγμα ο εκκινητής “L141R apoAI F” αντιστοιχεί στην μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>.

Το μείγμα του πλασμιδίου-μήτρας με τους εκκινητές επώαστηκε με την πολυμεράση PfuUltra<sup>®</sup> του προαναφερθέντος συστήματος και dNTPs σε PCR πρόγραμμα, όπως ορίζει η κατασκευάστρια εταιρεία (**Εικόνα 22**). Μετά από 18 κύκλους πολλαπλασιασμού, το προϊόν της PCR επώαστηκε με το περιοριστικό ένζυμο DpnI με σκοπό να καταστρέψει το μητρικό πλασμίδιο που αποτελείται από μεθυλιωμένο ή

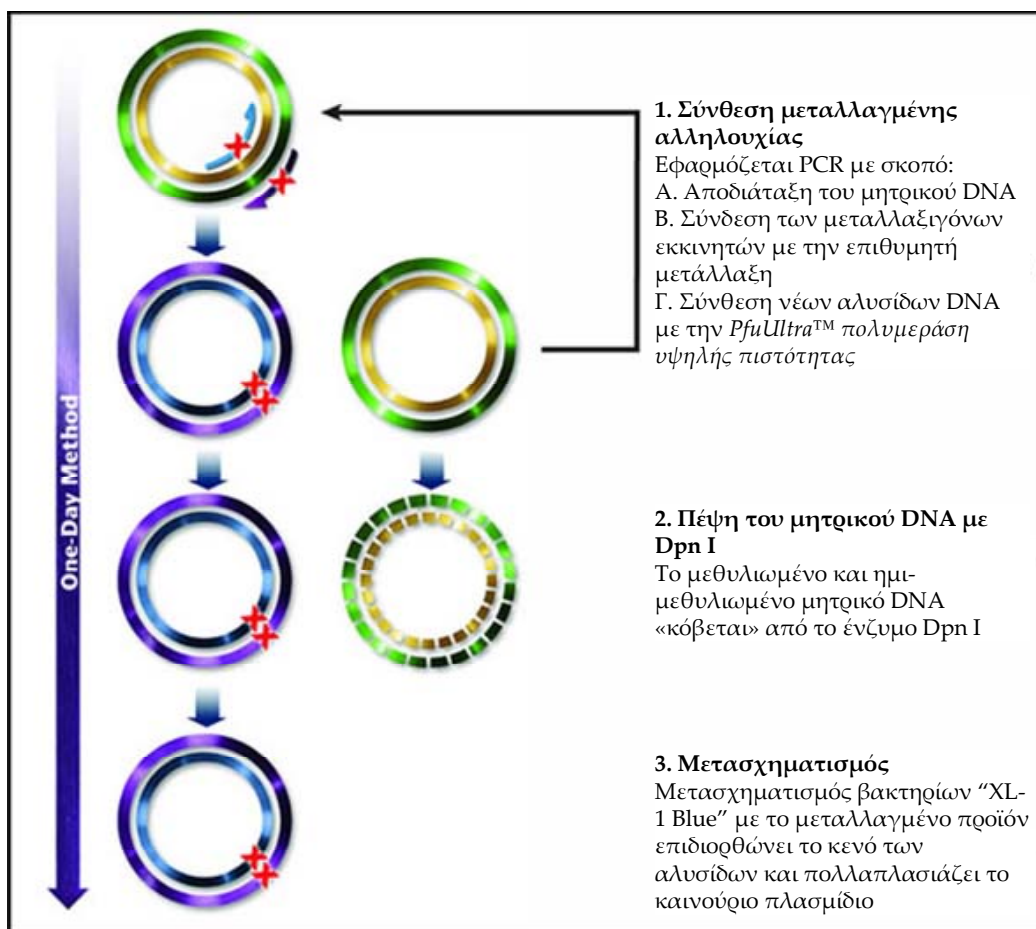
**ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ.** Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταλλάξεις στο γονίδιο της αποΑ-I.

Όνομα εκκινητή <sup>α</sup>	Αλληλουχία εκκινητών μετάλλαξης	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη <sup>β</sup>
L141R apoAI F L141R apoAI R	5'-CTGCAAGAGAAG <u>CGG</u> AGCCCACTGGGC-3' 5'-GCCCAGTGGGCT CCG CTTCTCTTGCAG-3'	T-1009-G
R149A apoAI F R149A apoAI R	5'-GCGAGGAGATG <u>GCC</u> GACCGCGCGCG-3' 5'-CGCGCGCGGTC GGC CATCTCCTCGC-3'	C-1032-G G-1033-C
R151C apoAI F R151C apoAI R	5'-GGGCGAGGAGATGCGCGA <u>TGC</u> GCGCGCGCCCATGTGGAC-3' 5'-GTCCACATGGGCGCGCGC GCA TCGCGCATCTCCTCGCCC-3'	C-1038-T
L159R apoAI F L159R apoAI R	5'-CATGTGGACGCG <u>CGG</u> CGCACGCATCTG-3' 5'-CAGATGCGTGCG CCG CGCGTCCACATG-3'	T-1063-G
R160L apoAI F R160L apoAI R	5'-GTGGACGCGCTG <u>CTC</u> ACGCATCTGGCC-3' 5'-GGCCAGATGCGT GAG CAGCGCGTCCAC-3'	G-1067-T
L178P apoAI F L178P apoAI R	5'-GCTTGGCCGCGCGC <u>CCT</u> GAGGCTCTCAAGGAGAACGG-3' 5'-CCGTTCTCCTTGAGAGCCTC AGG GCGCGCGGCCAAGC-3'	T-1120-C

<sup>α</sup> Ο αριθμός αμινοξέος αναφέρεται στην αλληλουχία της ώριμης πρωτεΐνης αποΑ-I στο πλάσμα

<sup>β</sup> Αριθμός νουκλεοτιδίου που μεταλλάχθηκε στην γενωμική αλληλουχία της ανθρώπινης αποΑ-I (Roghani and Zannis 1988) σε σχέση με το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής (ATG) και η αντικατάσταση νουκλεοτιδικής βάσης που χρησιμοποιήθηκε

<sup>γ</sup> Το κωδικόνιο που κωδικοποιεί για την κάθε μετάλλαξη είναι υπογραμμισμένο



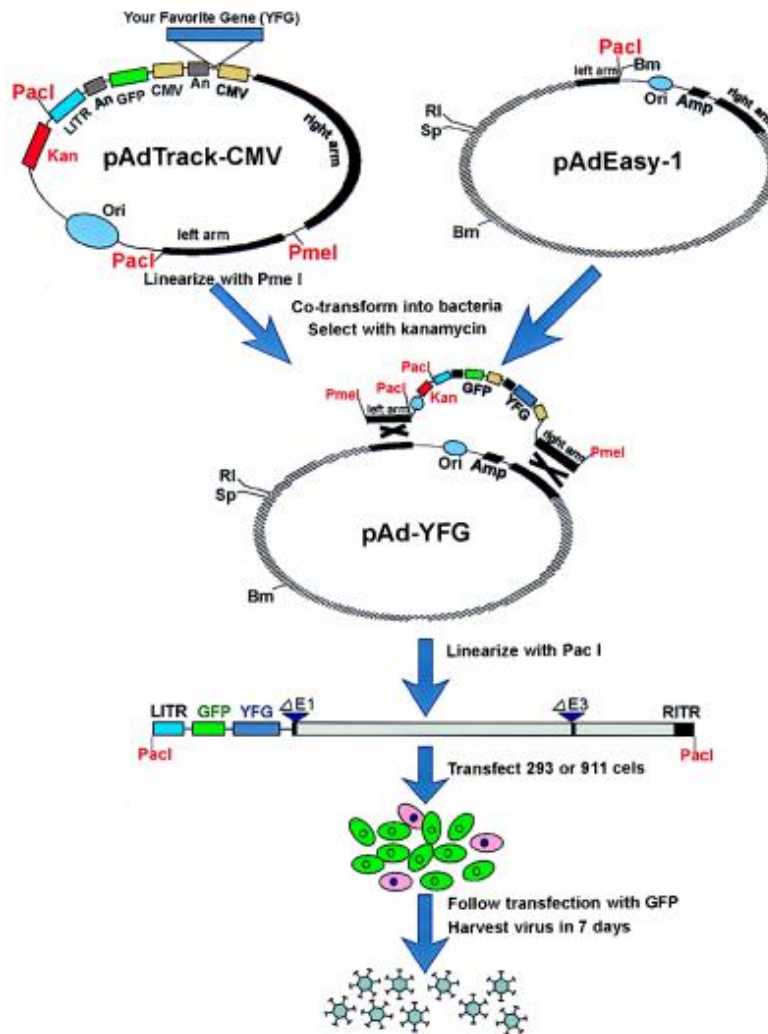
**Εικόνα 22.** Σχηματική απεικόνιση του συστήματος “QuickChange II Site Directed Mutagenesis Kit” της Stratagene και περιγραφή των βημάτων που οδηγούν στην δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων (Stratagene).

ημιμεθυλιωμένο DNA. Μετά την επώαση, το μείγμα της αντίδρασης, που περιέχει το νεο-συντιθέμενο DNA το οποίο φέρει τις μεταλλάξεις του γονιδίου της αποΑ-I που μας ενδιαφέρουν, χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό (transformation) δεκτικών κυττάρων (competent cells) XL10-Gold® (Stratagene). Κλώνοι ανθεκτικοί στην αμπικιλίνη (ampicillin) επιλέχθηκαν και το DNA τους απομονώθηκε. Ακολούθησε αλληλούχηση του γονιδίου της αποΑ-I για κάθε μεταλλαγμένη μορφή και επιβεβαιώθηκε η επιθυμητή κάθε φορά μετάλλαξη. Τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν για την κάθε μετάλλαξη, επώαστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και EcoRV και τα κομμάτια DNA που προέκυψαν, μεγέθους 2,2 kb, μεταφέρθηκαν στις αντίστοιχες περιοχές BglII και EcoRV του φορέα “pAdTrack-CMV” προκειμένου να κατασκευαστούν οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί, σύμφωνα με το σύστημα κατασκευής AdEasy™ της Stratagene.

### ***Ηλεκτροπόρωση κυττάρων και επιλογή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων***

Το αδενοϊκό πλασμίδιο κατασκευάστηκε σε βακτήρια “BJ-5183-AD1” (Stratagene) με ηλεκτροπόρωση (electroporation) των βακτηρίων παρουσία του φορέα “pAdTrack-CMV-X” (όπου X: το επιθυμητό γονίδιο), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Εικόνα 23). Χρησιμοποιήθηκαν 40 μl βακτηρίων BJ-5183-AD1 για κάθε πλασμιδιακή κατασκευή. Τα βακτήρια αυτά επάγουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό πλασμιδίων και φέρουν το πλασμίδιο “pAdEasy-1” το οποίο κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του αδενοϊού τύπου 5 (εκτός των E1/E5). Ανασυνδυασμός με το πλασμίδιο-φορέα “pAdTrack-CMV-X”, σχημάτισε τελικά ένα πλασμίδιο που φέρει παράλληλα με τα αδενοϊκά γονίδια και το επιθυμητό γονίδιο. Η ηλεκτροπόρωση έγινε με τις εξής παραμέτρους: 200 Ω, 2,5 kV,





**Εικόνα 23.** Σχηματική απεικόνιση του συστήματος κατασκευής ανασυνδυασμένων αδενοϊών, Ad-Easy™ Adenoviral Vector System της Stratagene. (Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο κείμενο).

25μF σε μηχανήμα ηλεκτροπόρωσης. Τα κύτταρα απλώθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε αμπικιλίνη. Οι σωστοί κλώνοι επιλέχθηκαν με βάση την ανθεκτικότητά τους στην αμπικιλίνη και την απώλεια ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Επίσης, μετά από απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες των κλώνων που προέκυψαν και ανάλυσή τους σε πήκτωμα αγαρόζης, ελέγχθηκε το μέγεθος των θετικών κλώνων, που φτάνει τις 32 kb. Οι σωστοί κλώνοι πολλαπλασιάστηκαν μετά από μετασχηματισμό βακτηρίων (competent cells) DH5a και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδίου κάθε μετάλλαξης σε μεγάλη κλίμακα.

#### **Κατασκευή ανασυνδυσμένων αδενοϊών**

Οι ανασυνδυσμένοι αδενοϊκοί φορείς (“pAd-X”) για κάθε μετάλλαξη της αποΑ-I επωάστηκαν με το περιοριστικό ένζυμο PacI για να γίνουν γραμμικά μόρια και 10 μg DNA χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση (transfection) κυττάρων 911. Για την διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο λιποσωμάτων Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 της Invitrogen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Δέκα με δώδεκα μέρες μετά την διαμόλυνση τα ιϊκά σωματίδια που παράχθηκαν προκάλεσαν λύση των κυττάρων και το λύμα χρησιμοποιήθηκε για μόλυνση καλλιέργειας κυττάρων 911 σε μεγαλύτερη κλίμακα, σε δοχεία καλλιέργειας T-175. Οι μολύνσεις έγιναν σε θρεπτικό μέσο L-15 με 2% HIHS και 1% αντιβιοτικών. Δύο με τρεις ημέρες μετά την μόλυνση, τα κύτταρα λύθηκαν και το καινούριο λύμα χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων HEK-293 που έχουν καλλιεργηθεί σε πληρότητα (confluency) σε δοχεία τριπλής επιφάνειας T-175 (triple flasks). Η μόλυνση έγινε σε θρεπτικό μέσο Leibovitz’s L-15 με 2% HIHS και 1% αντιβιοτικών. Με μόλυνση HEK-

293 κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα, παράχθηκαν μεγάλες ποσότητες ανασυνδυσμένων αδενοϊών οι οποίοι απομονώθηκαν 3 μέρες μετά την μόλυνση των κυττάρων σε φάση παραγωγής των ανασυνδυσμένων αδενοϊών και πριν επέλθει η λύση των κυττάρων. Τα κύτταρα που φέρουν τα αδενοϊκά σωμάτια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, σε μορφή ιζήματος. Το ίζημα υπέστη 3 κύκλους ψύξης / απόψυξης (-80 °C / 37 °C) ώστε να λυθούν τα κύτταρα και να απελευθερωθούν τα ικά σωμάτια. Με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές ανά λεπτό (rpm), για 10 λεπτά, διαχωρίζεται το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τα ικά σωμάτια από τα σπασμένα κύτταρα. Από το διάλυμα αυτό απομονώθηκαν τα ικά σωμάτια σε καθαρή μορφή μέσω δύο διαδοχικών υπερφυγοκεντρήσεων σε διαβάθμιση χλωριούχου καισίου (CsCl). Για την πρώτη φυγοκέντρηση τοποθετήθηκαν 2 ml διαλύματος CsCl I (0,619 g/ml in TE, όπου TE: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH: 8) που έχει δείκτη διάθλασης 1.379, πάνω από αυτά τοποθετήθηκαν 5 ml διαλύματος CsCl II (0,277 g/ml in TE) που έχει δείκτη διάθλασης 1.353 και τέλος τα 2-3 ml διαλύματος ικών σωματιδίων. Φυγοκέντρηση στις 30.000 rpm για 90 λεπτά, στους 4°C, συγκέντρωσε τα ικά σωμάτια σε μια ζώνη ενδιάμεσης πυκνότητας μεταξύ των διαλυμάτων CsCl I και CsCl II. Η ζώνη αυτή συλλέχθηκε με τη βοήθεια σύριγγας και μεταφέρθηκε σε διάλυμα 12 ml CsCl III (0,450 g/ml in TE). Ακολούθησε η δεύτερη φυγοκέντρηση στις 55.000 rpm στους 4°C, για 16-20 ώρες. Το βήμα αυτό συγκέντρωσε τα σωμάτια του αδενοϊού σε μια ζώνη πάχους περίπου 2mm. Η ζώνη συλλέχθηκε και εξισορροπήθηκε έναντι διαλύματος σουκρόζης [10mM Tris-HCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Sucrose, pH: 8] σε κασέτα διαπίδυσης Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> (MWCO: 10.000) της PIERCE. Το διάλυμα αδενοϊών χωρίστηκε σε μικρούς όγκους (aliquots) σε μικροδοχεία υπερκαταψύκτη (cryovials) και διατηρήθηκε στους -80°C. Την απομόνωση

των αδενοϊκών σωματιδίων ακολούθησε η τιτλοδότησή τους μέσω της δοκιμασίας σχηματισμού πλακών μόλυνσης (plaque assay).

#### ***Δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών (Plaque assay)***

Κύτταρα 911 σε πλήρη ανάπτυξη σε μονοστιβάδα μολύνθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων αδενοϊών. Συγκεκριμένα, καθαρισμένοι αδενοϊοί αραιώθηκαν  $5 \times 10^4$  έως  $5 \times 10^7$  φορές σε θρεπτικό μέσο Leibovitz's L-15 (συμπληρωμένο με 2% HIHS και 1% αντιβιοτικά) και χρησιμοποιήθηκαν για μόλυνση κυττάρων 911 που είχαν μεταφερθεί την προηγούμενη ημέρα σε δοχεία καλλιέργειας 6-well με πυκνότητα  $1,5 \times 10^6$  κυττάρων ανά πηγάδι καλλιέργειας (well). Τα κύτταρα έπειτα από 20 λεπτά επώασης με το διάλυμα του αδενοϊού, σταθεροποιήθηκαν στο δοχείο καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο [2x MEM, 4% Heat Inactivated Horse Serum (HIHS) και 25mM  $MgCl_2$ ] αραιωμένο με διάλυμα άγαρ [1,5% άγαρ, 40 mM HEPES, pH: 7,4] που στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37° C για δέκα (10) με δώδεκα (12) ημέρες. Πλάκες μόλυνσης/λύσης στη μονοστιβάδα κυττάρων φάνηκαν με γυμνό μάτι ως γκριζες περιοχές ενώ για αδενοϊούς που εκφράζουν παράλληλα και την πρωτεΐνη GFP εντοπίστηκαν με τη βοήθεια φθορίζοντος μικροσκοπίου, μετρήθηκαν για κάθε αραιώση και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του τίτλου (συγκέντρωσης) των αδενοϊικών σωματιδίων της κάθε αδενοϊκής κατασκευής.

***Έκφραση και έκκριση της αγρίου τύπου (WT) και των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I.***

Για να εκτιμηθεί η έκφραση και έκκριση των διαφόρων μορφών της αποΑ-I που κατασκευάστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HTB13 σε πληρότητα 80% και σε 5 ml θρεπτικού μέσου Leibovitz's L-15 συμπληρωμένο με 2% HHS, σε καλλιέργεια σε πιάτα διαμέτρου 100mm (P-100 petri dishes). Τα κύτταρα μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν μορφές της αποΑ-I σε πολλαπλότητα μόλυνσης (MOI: multiplicity of infection) 20. Ως πολλαπλότητα μόλυνσης ορίζεται ο αριθμός μολυσματικών σωματιδίων αδενοϊών ανά κύτταρο. Είκοσι τέσσερις (24) ώρες μετά την μόλυνση, τα κύτταρα πλύθηκαν με 1x PBS και επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο άνευ ορού, για 2 ώρες. Στη συνέχεια, καινούριο θρεπτικό μέσο Leibovitz's L-15 προστέθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες. Μετά τις 24 ώρες, το θρεπτικό μέσο συλλέχθηκε και ένα δείγμα του αναλύθηκε με SDS-PAGE για έκφραση της πρωτεΐνης αποΑ-I. Η ποσότητα της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με παράλληλη ανάλυση συγκεκριμένης ποσότητας (1-10 µg) πρωτεΐνης BSA.

***Παραγωγή της WT και των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I χρησιμοποιώντας το σύστημα των ανασυνδυασμένων αδενοϊών.***

Για την παραγωγή πρωτεΐνης αποΑ-I σε μεγάλη κλίμακα, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HTB13 (SW 1783, human astrocytoma) σε πληρότητα 80 %, σε θρεπτικό μέσο Leibovitz's L-15 συμπληρωμένο με 10 % (v/v) FBS, καλλιεργούμενα σε κυλινδρικά δοχεία καλλιέργειας. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με αδενοϊούς κατασκευασμένους να εκφράζουν την αγρίου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I, σε πολλαπλότητα

μόλυνσης (moi, multiplicity of infection) 20. Μετά από 24 ώρες επώασης με τους αδενοϊούς, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 1x PBS, επώαστηκαν για 1 ώρα σε φρέσκο θρεπτικό μέσο, Leibovitz's L-15 χωρίς FBS, και αφού το μέσο ανανεώθηκε, αφέθηκε για άλλες 24 ώρες επώασης. Μετά τις 24 ώρες, το θρεπτικό μέσο συλλέχθηκε και καινούριο μέσο προστέθηκε στα κυλινδρικά δοχεία, για άλλες 24 ώρες. Η συλλογή (harvest) του θρεπτικού μέσου επαναλήφθηκε 5-6 φορές συλλέγοντας συνολικά περίπου 1 L θρεπτικού για κάθε μορφή της πρωτεΐνης αποΑ-I.

#### ***Απομόνωση και καθαρισμός της WT και των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I.***

Η πρωτεΐνη που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο που συλλέχθηκε από τα κυλινδρικά δοχεία καλλιέργειας, απομονώθηκε με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιώντας HiTrapQ κολόνες των 5 ml (Amersham) ακολουθούμενη από χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιώντας στήλες Hi-Prep Sephacryl S-200 όπως έχει περιγραφεί από τους Laccotripe και συνεργάτες (Laccotripe et al. 1997). Συγκεκριμένα, το θρεπτικό μέσο εξισορροπήθηκε με διαπίδυση έναντι διαλύματος 0.01 M Tris-HCl, pH: 8, μέσα σε μεμβράνη διαπίδυσης (Dialysis tubing) διαμέτρου 28.6 mm της Fisher Scientific που συγκρατεί μόρια μεγαλύτερα των 12 kDa (MWCO: 12.000-14.000). Το θρεπτικό μέσο για κάθε μορφή της αποΑ-I πέρασε από φίλτρο, για απομάκρυνση κυττάρων που έχουν παραμείνει και πρωτεϊνών που κατακρημνίστηκαν κατά την διαπίδυση, και «φορτώθηκε» στην κολόνα ιοντο-ανταλλάγης με ταχύτητα 2 ml/min. Η έκλουση της κολόνας έγινε με κλίση συγκέντρωσης από 100% διαλύματος 0.01M Tris-HCl σε 100% διαλύματος 1M Ανθρακικού Αμμωνίου (Ammonium Bicarbonate) και με ρυθμό 1 ml/min. Συλλέχθηκαν κλάσματα των 3ml σε γυάλινους σωλήνες και δείγμα τους (50μl) αναλύθηκε σε πήκτωμα

πολυακρυλαμίδης. Τα κλάσματα που περιείχαν πρωτεΐνη αποΑ-I αναμείχθηκαν μεταξύ τους και συγκεντρώθηκαν σε όγκο  $\leq 3$  ml με φυγοκέντρηση σε φίλτρα συγκέντρωσης Centriplus YM-10 της Amicon (10.000 MWCO). Το διάλυμα που προέκυψε «φορτώθηκε» με σύριγγα στη στήλη μοριακής διήθησης και εκλούστηκε με διάλυμα 0.15 M Ανθρακικού Αμμωνίου με ταχύτητα 0.4 ml/min. Δείγμα (20  $\mu$ l) από τα κλάσματα αναλύθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτά που περιείχαν πρωτεΐνη αποΑ-I αναμείχθηκαν μεταξύ τους. Το διάλυμα που προέκυψε ξηράθηκε σε λυοφιλοποιητή Sentry 2.0 (VisTis) για καλύτερη συντήρηση της καθαρισμένης πρωτεΐνης και απαλλαγής από το διαλύτη (ανθρακικό αμμώνιο) ο οποίος εξαχνώθηκε.

Αναδιάλυση της καθαρής πρωτεΐνης για χρήση σε *in vitro* πειράματα, έγινε σε διάλυμα 1x PBS σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τις ανάγκες του πειράματος.

#### ***Έξοδος χοληστερόλης μέσω ABCA1.***

Η ABCA1-εξαρτώμενη έξοδος χοληστερόλης υπολογίστηκε μέσω χρήσης μακροφάγων κυττάρων ποντικού. Συγκεκριμένα, τα μακροφάγα J774 στα οποία η έκφραση του μεταφορέα ABCA1 επάγεται μέσω του αναλόγου του cAMP, cpt-cAMP (8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate) ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Chroni *et al.* (Chroni *et al.* 2003). Συγκεκριμένα, κύτταρα J774 «στρώνονται» σε πιάτα 12 πηγαδιών (12-well plates) σε πυκνότητα  $5 \times 10^5$  κύτταρα/well σε θρεπτικό μέσο [DMEM με 4.5 g/L γλυκόζη, 10% (v/v) FBS και 1% αντιβιοτικών]. 24 ώρες μετά, τα κύτταρα επισημαίνονται με 8  $\mu$ Ci/ml [ $^{14}$ C]-χοληστερόλη για άλλες 24 ώρες. Μετά την επισήμανσή τους με ραδιενεργή χοληστερόλη, τα κύτταρα επώαστηκαν

για άλλες 24 ώρες, με 1 ml θρεπτικού μέσου ενεργοποίησης το οποίο περιέχει το ανάλογο του cAMP (cpt-cAMP) σε συγκέντρωση 0,3 mM, σε DMEM με 4,5 g/L γλυκόζης, συμπληρωμένο με 0,2% (w/v) BSA, παρουσία αντιβιοτικών. Στο τέλος της επώασης ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 1x PBS και επώαση των κυττάρων με θρεπτικό μέσο που περιέχει, εκτός της BSA, και την πρωτεΐνη-αποδέκτη της χοληστερόλης (WT ή μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I) σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M. Η επώαση συνεχίζεται για 4 ώρες οπότε και συλλέγεται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα. Το θρεπτικό μέσο καθαρίζεται από τα κύτταρα που αιωρούνται με φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 5 λεπτά. Από το υπερκείμενο, 40  $\mu$ l χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση της ραδιενεργού χοληστερόλης που περιέχουν σε 10 ml υγρού σπινθηρισμού (scintillation cocktail), και για εκτίμηση της χοληστερόλης που έχει εξέλθει από τα κύτταρα. Τα κύτταρα στα πιάτα καλλιέργειας επώάζονται για 20 λεπτά με διάλυμα λύσης (0,8 ml PBS, 0,1% Triton-X 100 και 1mM PMSF), σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Από το κυτταρικό λύμα μετρήθηκε η ραδιενέργεια σε 40  $\mu$ l σε 10 ml υγρού σπινθηρισμού και υπολογίστηκε η συνολική ραδιενέργεια που υπάρχει στα κύτταρα. Το ποσοστό της εξερχόμενης [ $^3$ H]-χοληστερόλης υπολογίστηκε διαιρώντας τις κρούσεις που μετρήθηκαν στο θρεπτικό μέσο με τις κρούσεις από το σύνολο των κρούσεων τόσο του θρεπτικού όσο και αυτών του κυτταρικού λύματος. Για τον υπολογισμό της καθαρής (net) c-AMP-εξαρτώμενης εξόδου χοληστερόλης, τα ποσοστά εξόδου χοληστερόλης από κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε το ανάλογο του cAMP (μη ειδική έξοδος χοληστερόλης), αφαιρέθηκε από τα ποσοστά εξόδου χοληστερόλης κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε ο ενεργοποιητής cpt-cAMP (ολική έξοδος χοληστερόλης). Το ποσοστό εξόδου χοληστερόλης που επάγει η WT apoAI στις 4 ώρες



επώασης ορίστηκε ως 100% και χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση με της μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I.

#### ***Κατασκευή ανασυνδυασμένης HDL (rHDL).***

Τα σωματίδια ανασυνδυασμένης HDL (reconstituted HDL, rHDL) περιείχαν χοληστερόλη και [<sup>14</sup>C]-χοληστερόλη ([4-<sup>14</sup>C] cholesterol, 0.04 mCi/ml, ειδικής ενεργότητας 45 mCi/mmol, της Perkin-Elmer Life Sciences, Inc.), φωσφολιπίδια β-oleoyl-γ-palmitoyl-L-α-phosphatidylcholine (POPC, της Sigma) και πρωτεΐνη apoA-I, και κατασκευάστηκαν με την μέθοδο διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου (sodium cholate) όπως περιγράφεται από τους Jonas και Matz (Matz and Jonas 1982).

Συγκεκριμένα, τα POPC, χοληστερόλη, apoA-I και χολικό νάτριο συνδυάστηκαν σε τελική μοριακή αναλογία 100:10:1:100 (mol/mol), αντίστοιχα, συμπληρωμένα με [<sup>14</sup>C]-χοληστερόλη που αντιστοιχεί σε 5000-7000 cpm/nmole μη ραδιενεργής χοληστερόλης. Αρχικά τα POPC (2,71 gr POPC ανά 1 gr apoA-I πρωτεΐνης, σε ένα τυπικό πείραμα) συνδυάστηκαν με την χοληστερόλη (0,14 gr χοληστερόλης ανά 1 gr apoA-I πρωτεΐνης) (ραδιενεργή και μη). Το μείγμα αναδεύτηκε σε γυάλινο σωληνάριο υπό συνεχή παροχή αζώτου (προς αποφυγή οξείδωσης) μέχρι να στεγνώσει. Στην συνέχεια προστέθηκαν 250 μl από διάλυμα άλατος [1x Salt buffer : 10 mM Tris-HCl, pH:8, 150 mM NaCl, 0.01% EDTA] και με ήπια ανάδευση στους 4 °C επί μίας ώρας, διαλυτοποιήθηκαν τα λιπίδια. Προσθήκη χολικού νατρίου και ανάδευση στον πάγο για 1 ώρα δημιουργεί μικκύλια λιπιδίων. Τέλος, προστέθηκε η πρωτεΐνη apoA-I και με ανάδευση σε πάγο για άλλη 1 ώρα δημιουργήθηκαν δισκοειδή σωματίδια HDL λιποπρωτεϊνών (rHDL). Τα rHDL σωματίδια που κατασκευάστηκαν εξισορροπήθηκαν με διαπίδυση (dialysis) μέσω

μεμβράνης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν έξοδο μορίων μάζας (MWCO) μικρότερης των 12-14 kDa, έναντι 1x Salt buffer, στους 4 °C, για την απομάκρυνση του χολικού νατρίου. Για την απομάκρυνση ελεύθερης αποΑ-I ακολούθησε επιπλέον διαπίδυση σε διάλυμα 1x Salt buffer με μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO τα 50 kDa.

#### ***Δοκιμή ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT.***

Οι αντιδράσεις δοκιμής της ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT έγιναν με αυξανόμενη ποσότητα rHDL, για κάθε μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I, κρατώντας σταθερή την ποσότητα του ενζύμου (Chroni et al. 2004a). Η ποσότητα της rHDL καθορίστηκε με βάση την περιεκτικότητα των σωματιδίων σε πρωτεΐνη αποΑ-I και ήταν από 0,0007 mg μέχρι 0,032 mg πρωτεΐνης. Η χαμηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος περιείχε τουλάχιστον 5.000 cpm ραδιενεργής χοληστερόλης. Τα σωματίδια rHDL προστέθηκαν σε γυάλινο σωληνάριο μαζί με 50μl διαλύματος 40mg/ml BSA και 20 μl διαλύματος 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλης. Το μείγμα αναδεύτηκε ισχυρά (vortex) και επώαστηκε στους 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, και σε ακριβής χρόνους, προστέθηκε το ένζυμο LCAT (2,8 μg σε όγκο 25μl) και η επώαση συνεχίστηκε για άλλα 30 λεπτά. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 5 ml διαλύματος χλωροφορμίου:μεθανόλης (σε αναλογία 2:1) συμπληρωμένο με 40 ng/ml ολεϊκού εστέρα χοληστερόλης και χοληστερόλης. Το μείγμα αναδεύτηκε ισχυρά για την εκχύλιση των λιπιδίων και αφέθηκε στους 4°C για τουλάχιστον 40 λεπτά, ώστε να διαχωριστεί η οργανική από την ανόργανη φάση. Η υδατική φάση (υπερκείμενο) απομακρύνθηκε με γυάλινη πιπέτα Pasteur και η κάτω (οργανική) φάση ξηράθηκε υπό ρεύμα αζώτου. Αναδιάλυση του υπολείμματος σε 75μl χλωροφορμίου επέτρεψε την μεταφορά και ανάλυσή των λιπιδίων σε χρωματογραφική

πλάκα λεπτής στοιβάδας ITLC (Pall Corporation). Η πλάκα αναπτύχθηκε για 5 λεπτά σε διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα: αιθύλ-αιθέρα: οξικού οξέος σε αναλογία όγκων 85:15:1. Οι ζώνες των εστέρων χοληστερόλης και της ελεύθερης χοληστερόλης εμφανίστηκαν ως κίτρινες ζώνες από την έκθεση της πλάκας σε ατμούς ιωδίου για 15 με 20 δευτερόλεπτα, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό των διαφόρων ζωνών. Η εστεροποιημένη χοληστερόλη μεταναστεύει πιο γρήγορα στην χρωματογραφία αυτή ενώ η ελεύθερη χοληστερόλη σχεδόν στην μισή ταχύτητα. Στην συνέχεια η πλάκα αφέθηκε σε ρεύμα αέρα ώστε να εξαχνωθεί το ιώδιο. Οι ζώνες που περιείχαν την εστεροποιημένη χοληστερόλη και την ελεύθερη χοληστερόλη κόπηκαν και τοποθετήθηκαν χωριστά σε σωλήνες μαζί με διάλυμα σπινθηρισμού (scintillation mix). Ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex) και μέτρηση των κρούσεων σε μετρητή σπινθηρισμού (LKB Scintillation counter).

Ο ρυθμός με τον οποίον η χοληστερόλη εστεροποιείται εκφράστηκε ως τα nmoles εστέρων χοληστερόλης που σχηματίζονται ανά ώρα (nmoles/h). Για να υπολογιστεί η πειραματική  $V_{max}$  ( $V_{max_{app}}$ ) και το πειραματικό  $K_m$  ( $K_{m_{app}}$ ) της αντίδρασης, ο ρυθμός σχηματισμού εστέρων χοληστερόλης συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του υποστρώματος, δηλαδή της αποΑ-I. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στην κλασική κινητική Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism (GraphPad Software, Inc.).

Λόγω της χαμηλής καταλυτικής ενεργότητας των μεταλλάξεων αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala) και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, οι τιμές των  $K_{m_{app}}$  και  $V_{max_{app}}$  για τις μεταλλάξεις αυτές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας 20 φορές υψηλότερη συγκέντρωση ενζύμου LCAT, σε

σχέση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την WT μορφή της αποΑ-I. Για την σύγκριση των παραμέτρων της κινητικής των μεταλλάξεων αυτών, οι τιμές προσαρμόστηκαν με διαίρεση των πειραματικών τιμών  $V_{max_{app}}$  των μεταλλάξεων διά του 20.

### ***Εκτίμηση της καταλυτικής δραστηριότητας της LCAT του πλάσματος ποντικών***

Για την εκτίμηση της ενεργότητας της LCAT του πλάσματος ποντικών που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I μόνες τους ή σε συνδυασμό με την LCAT του ανθρώπου, εφαρμόστηκε η δοκιμή που περιγράφεται παραπάνω με τη διαφορά ότι αντί της καθαρής μορφής του ενζύμου LCAT, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος ποντικών. Ως υπόστρωμα για την LCAT του πλάσματος χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια rHDL κατασκευασμένα με WT αποΑ-I, σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Χρησιμοποιήθηκαν 4 μl πλάσματος ποντικών το οποίο συλλέχθηκε 4 ημέρες μετά την ένεσή τους με αδενοϊούς που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>. Στην περίπτωση ποντικών που ενέθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την παραπάνω μεταλλαγμένη μορφή, σε συνδυασμό με αδενοϊούς που εκφράζουν την LCAT του ανθρώπου, χρησιμοποιήθηκαν 0.4 μl πλάσματος, λόγω της υψηλής LCAT ενεργότητας του. Η αραίωση αυτή του πλάσματος ελήφθη υπ' όψιν κατά τον υπολογισμό της LCAT ενεργότητας του πλάσματος. Οι υπολογισμοί της καταλυτικής δραστηριότητας της LCAT έγιναν όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

### ***Μελέτες σε μοντέλα ζώων.***

Χρησιμοποιήθηκαν επίμυες με έλλειψη της αποΑ-I (ApoA1<sup>tm1Unc</sup>) σε C57BL/6 γενετικό υπόβαθρο (Williamson et al. 1992) τα οποία αγοράστηκαν από τα Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Τα ποντίκια διατηρήθηκαν σε 12-ωρο κύκλο φωτός/σκοταδιού και υπό φυσιολογική δίαιτα (rodent chow diet). Όλες οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν στο χειρισμό των ζώων ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (NIH) των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής και του Ινστιτούτου Καρδιαγγειακών Παθήσεων του Πανεπιστημίου της Βοστώνης. Επίμυες με έλλειψη της πρωτεΐνης αποΑ-I, ηλικίας 6-8 εβδομάδων, ενέθηκαν μέσω της πυλαίας φλέβας με  $1-2 \times 10^9$  pfu ανασυδρασμένων αδενοϊών ανά ζώο και θυσιάστηκαν 4 μέρες μετά την ένεση, έπειτα από νηστεία 4 ωρών. Για το χειρισμό των ποντικών και την συλλογή αίματος και του ηπατικού ιστού, χρησιμοποιήθηκαν ατμοί του αναισθητικού isoflurane.

### ***Απομόνωση πλάσματος από αίμα ποντικών.***

Για τη συλλογή δειγμάτων αίματος από την άκρη της ουράς των ποντικών και την επακόλουθη απομόνωση πλάσματος από αυτό, χρησιμοποιήθηκαν μικροσωλήνες Microvette CB 300 K2E (STARSTEDT). Η συλλογή μεγάλων ποσοτήτων αίματος κατά το θυσιασμό των ποντικών, έγινε σε σωλήνες φυγοκέντρησης Microtube 1.3ml KE (. Οι σωλήνες αυτοί είναι επικαλυμμένοι με EDTA. Από κάθε επίμυ συλλέχθηκαν περίπου 750 µl αίματος. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4000 rpm για 5 λεπτά διαχωρίζει το πλάσμα το οποίο συλλέχθηκε σε καινούρια μικροδοχεία και φυλάχθηκε στους 4°C μέχρι περαιτέρω αναλύσεων.

***Μετρήσεις επιπέδων λιπιδίων και απολιποπρωτεΐνης A-I στο πλάσμα ποντικών.***

Η συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης (TC), ελεύθερης χοληστερόλης (FC), φωσφολιπιδίων (Ph) και τριγλυκεριδίων (Tg) στο πλάσμα ποντικών που συλλέχθηκε τέσσερις μέρες μετά την μόλυνση με αδενοϊούς, υπολογίστηκε μέσω των αντιδραστηρίων Cholesterol E, Free Cholesterol C, Phospholipids B της Wako Chemicals USA, Inc. και INFINITY triglycerides της ThermoDMA, αντιστοίχως, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση των εστέρων χοληστερόλης υπολογίστηκε με αφαίρεση της συγκέντρωσης της ελεύθερης χοληστερόλης από αυτή της ολικής χοληστερόλης. Τα επίπεδα αποA-I στο πλάσμα υπολογίστηκαν με το AutoKit-AI της Wako Chemicals USA, Inc. σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνήθως οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας 3-8 μl πλάσματος και ακολούθησε αναγωγή των μετρήσεων σε συγκέντρωση mg/dl.

***Χρωματογραφία διήθησης υγρής στοιβάδας (FPLC).***

Για την ανάλυση του πλάσματος με διαχωρισμό σε χρωματογραφία διήθησης υγρής στοιβάδας (Fast Pressure Liquid Chromatography, FPLC), χρησιμοποιήθηκαν 17 μl πλάσματος από επίμυες μολυσμένους με αδενοϊούς που εκφράζουν την αγίου τύπου (wild type, WT) ή μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I ή μόνο την πρωτεΐνη-ελέγχου GFP. Το πλάσμα αραιώθηκε 3 φορές σε 1x PBS και αναλύθηκε σε κολόνα Superose 6 PC 3.2/30 της General Electric στο σύστημα SMART microFPLC της Amersham Biosciences με έκλουση σε 1x PBS (phosphate buffer saline) και σε ταχύτητα 50 μl/min. Συνολικά, συλλέχθηκαν 25 κλάσματα όγκου 50 μl το καθένα. Τα επίπεδα λιπιδίων (TC, FC, Ph και Tg) στα κλάσματα της FPLC προσδιορίστηκαν ως ανωτέρω.

***Κλασμάτωση πλάσματος μέσω υπερφυγοκέντρωσης σε κλίση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου.***

Χρησιμοποιήθηκαν 300  $\mu$ l πλάσματος ποντικών αραιωμένα με ρυθμιστικό διάλυμα 1x PBS, σε τελικό όγκο 0.5 ml . Το μείγμα ρυθμίστηκε με προσθήκη 181 mg Βρωμιούχου Καλίου (KBr) σε πυκνότητα 1.23 g/ml και μεταφέρθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρου Ultraclear™ (Beckman Instruments , Inc.). Πάνω από το δείγμα προστέθηκαν με τη σειρά 1 ml διαλύματος KBr πυκνότητας d=1.21 g/ml, 2.5 ml διαλύματος KBr πυκνότητας d=1.063 g/ml, 0.5 ml διαλύματος KBr πυκνότητας d=1.019 g/ml, και 0.5 ml 1x PBS. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 22 h, σε κεφαλή SW55, στις 30.000 στροφές ανα λεπτό (rpm). Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης, κλάσματα 0.5 ml συλλέχθηκαν από την κορυφή του μίγματος, για περαιτέρω αναλύσεις. Ο δείκτης διάθλασης (refractive index) του κάθε κλάσματος μετρήθηκε σε μετρητή διάθλασης (refractometer) της American Optical Corp. και η μέτρηση μετατράπηκε σε πυκνότητα με βάση πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε με διαλύματα γνωστής πυκνότητας. Τα κλάσματα στην συνέχεια εξισορροπήθηκαν με διαπίδυση έναντι H<sub>2</sub>O και 100  $\mu$ l από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με SDS-PAGE. Οι ζώνες των απολιποπρωτεϊνών και η κατανομή τους φάνηκαν μετά από χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με χρωστική Coomassie Brilliant Blue.

***Ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (EM) των κλασμάτων που περιέχουν πρωτεΐνη αποΑ-I.***

Για την ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου τα κλάσματα του πλάσματος μετά την υπερφυγοκέντρωση, εξισορροπήθηκαν με διαπίδυση έναντι διαλύματος EM [EM buffer: 126 mM οξικό αμμώνιο, 2,6 mM ανθρακικό αμμώνιο, 0,26 mM EDTA, pH 7,4].

Δείγματα από τα κλάσματα 6 έως 8, τα οποία επιπλέον στην περιοχή πυκνότητας της HDL ( $1.100 \text{ g/ml} \leq d \leq 1.152 \text{ gr/ml}$ ), υπέστησαν χρώση με θειούχο φωσφο-βολφράμιο (sodium phosphotungstate), απεικονίστηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Phillips CM-120 (Phillips Electron Optics, Eindhoven, Netherlands) και φωτογραφήθηκαν από τον Dr. Donald Gantz του Τομέα Βιοφυσικής του Πανεπιστημίου της Βοστώνης. Οι φωτομικρογραφίες έχουν μεγεθυνθεί κατά 225.000 φορές.

***Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D).***

Η κατανομή των κλασμάτων της HDL στο πλάσμα αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σύμφωνα με τους Fielding και Fielding (Fielding and Fielding 1996), με μικρές αλλαγές. Συγκεκριμένα, στην πρώτη διάσταση που αναλύει τα σωματίδια κυρίως βάση του φορτίου τους, 0.5 με 1 μl πλάσματος αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,75% στα 75 Volts (V), στους 4°C, σε διάλυμα 50 mM barbital (pH 8.6, Sigma, St. Louis, MO) για 2 περίπου ώρες και μέχρι η χρωστική bromophenol blue των δειγμάτων να προχωρήσει 5,5 cm από το σημείο εκκίνησης. Λωρίδες κατά μήκος του πηκτώματος αγαρόζης πλάτους 2 mm, που φέρουν τις υπό ανάλυση λιποπρωτεΐνες, μεταφέρθηκαν σε πήκτωμα με κλίση συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης 4% ως 20%, αγορασμένα από την εταιρία BIO-RAD®.

Η ανάλυση στην δεύτερη διάσταση που αναλύει τα σωματίδια κυρίως βάση του μεγέθους τους, έγινε στα 90 V, στους 4 °C, σε μη αποδιατακτικό διάλυμα 1x TG [1L 10x TGS : 30,2 gr Tris-HCl, 144 gr Glycine], για 2-3 ώρες. Οι λιποπρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση της πρωτεΐνης αποΑ-I επιτεύχθηκε μέσω του αντισώματος AB740 έναντι της ανθρώπινης



αποΑ-I, σε αραιώση 1:2000 (goat polyclonal anti-human apoA-I antibody, από την Chemicon International).

### ***Απομόνωση RNA και ανάλυση κατά Northern.***

Ολικό RNA απομονώθηκε από το ήπαρ επίμυων, τέσσερις μέρες μετά την μόλυνση με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς, με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol<sup>®</sup> της Invitrogen και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν περί τα 5 mm<sup>3</sup> ηπατικού ιστού και 1ml αντιδραστηρίου Trizol. Ομογενοποίηση του ιστού έγινε για 30 sec σε ομογενοποιητή Minibeadbeater της Biospec Products. Ακολούθησε εκχύλιση με 100 μl χλωροφορμίου και ομογενοποίηση του δείγματος, για 10 sec. Το RNA απομονώθηκε έπειτα από φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά, στην υδατική φάση (υπερκείμενο). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούριο μικροσωλήνα φυγοκέντρησης και ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με ίσο όγκο ισοπροπανόλης (περίπου 450 μl) και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, για 20 λεπτά. Αναδιάλυση του RNA έγινε σε νερό απαλλαγμένο από RNάσες με χρήση DEPC (Diethylpyrocarbonate).

Για την ανάλυση κατά Northern, δείγματα 15 μg ολικού RNA αποδιατάχθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης (RNA loading buffer) [125μl Dianozed Formamide, 40μl Formaldehyde, 20μl RNA running buffer και χρωστική bromophenol blue] με επώαση στους 65°C, για 10 λεπτά, και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 1.0% πήκτωμα φορμαλδεΐδης-αγαρόζης στα 20 V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης RNA (RNA running buffer), [20mM MOPS, 5mM Na-Acetate και 1mM EDTA], για 16-18 ώρες. Το πήκτωμα για την ανάλυση του RNA κατασκευάστηκε με 1 gr αγαρόζης σε 75 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, και προσθήκη 16,7 ml Φορμαλδεΐδης, 7,5 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης RNA και 5 μl Βρωμιούχου Αιθιδίου. Η δέσμευση του βρωμιούχου αιθιδίου στο RNA και παρατήρηση

υπό UV ακτινοβολία επιβεβαίωσε την ποιότητα και το ισόποσο μεταξύ των δειγμάτων. Στην συνέχεια το RNA μεταφέρθηκε από το πήκτωμα σε νάιλον μεμβράνη Hybond XL<sup>®</sup> της Amersham σε διάλυμα 10x SSC [1,5 M NaCl; 0,3 M κιτρικό νάτριο, pH: 7], για 16 ώρες. Μετά την μεταφορά του RNA στην μεμβράνη, η τελευταία εκπλένεται σε 2x SSC διάλυμα. Ακολούθησε πρόσδεση του RNA στην μεμβράνη (cross-linking) με ακτινοβολία στο υπεριώδες (UV irradiation) μέσω του Stratalinker της εταιρίας Stratagene, στα 0.12 J/cm<sup>2</sup> για 30 sec.

**Ανιχνευτές επιπέδων έκφρασης mRNA (probes).**

Για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης mRNA μέρους των γονιδίων που μελέτησα, χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες 200-300 νουκλεοτιδίων από τα αντίστοιχα γονίδια στόχους. Για την απόκτησή τους έγινε PCR με κατάλληλους εκκινητές (primers) σε DNA πλασμίδια που φέρουν την αλληλουχία του κάθε γονιδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Γονίδιο στόχος	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (primer)	Πλασμίδιο-φορέας γονιδίου
apoA-I	Εκκινητής 1	5'-AGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAA-3'	pUC19-apoAIg
	Εκκινητής 2	5'-CACTTCTTCTGGAAGTCGTCCAGGTA-3'	
human RXRa	Εκκινητής 1	5'-GACATGGACACCAAACATTTTCCTG-3'	pCDNA3-hRXRa
	Εκκινητής 2	5'-ATGTGCTTGGTGAAGGAAGCCAT-3'	

Οι υπόλοιποι ανιχνευτές κατασκευάστηκαν από τα πλασμίδια που φέρουν τις αλληλουχίες στόχους, με χρήση εκκινητών τυχαίων εξάδων νουκλεοτιδίων (random

hexamers) σε αντιδράσεις πολυμερισμού. Για το γονίδιο-στόχος GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) του ποντικού χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pTRI-GAPDH-Mouse της AMBION. Για το γονίδιο-στόχος HNF4α του ανθρώπου χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pMT2-HNF4α, ενώ για τα Smad3 και Smad7 χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pcDNA3-Smad3 και pcDNA3-Smad7, που φέρουν τις αντίστοιχες cDNA αλληλουχίες και προσφέρθηκαν ευγενικά από το εργαστήριο του Δρ. Καρδάση.

Οι ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων (probes) κατασκευάστηκαν μέσω του συστήματος Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και βασίζεται την τυχαία εκκίνηση και αντιγραφή του DNA και επισήμανσή του με [<sup>32</sup>P]dCTP.

#### ***Υβριδοποίηση των ανιχνευτών (probes) με το RNA.***

Για την υβριδοποίηση των ανιχνευτών με το RNA οι μεμβράνες επώαστηκαν σε διάλυμα προ-υβριδοποίησης (pre-hybridization buffer) [5x Denhardt's buffer, 50% Deionized formamide, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 0,8M NaCl, 0,1% Sodium Phosphate, 10% Dextran Sulfate, 100 µg/ml Salmon sperm DNA, 0,5% SDS] στους 55°C, για 4 ώρες και στη συνέχεια το διάλυμα αντικαταστάθηκε με νέο διάλυμα στο οποίο προστέθηκε ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής (probe). Η υβριδοποίηση γίνεται στους 55°C, για 16 ώρες.

Οι μεμβράνες μετά την υβριδοποίηση πλύθηκαν με διάλυμα πλύσης (wash buffer) [2x SSC, 0,01% SDS] σε θερμοκρασία δωματίου, 2 με 3 φορές, αλλάζοντας το διάλυμα πλύσης, μέχρι η μέτρηση της ραδιενέργειας να πέσει στις 5000 κρούσεις ανα λεπτό (cpm) και το σήμα να είναι μεγαλύτερο του θορύβου (background) κατά 3 φορές.

Για την απεικόνιση του σήματος, φιλμ εκτέθηκε στις μεμβράνες για τουλάχιστον 2 ώρες, ανάλογα την ένταση του σήματος, και στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για ελαχιστοποίηση διάχυσης του σήματος. Ποσοτικοποίηση του σήματος του ανιχνευτή έγινε με χρήση PhosphorImager (model 400B) της Molecular Dynamics. Η κανονικοποίηση (normalization) του σήματος για έκφραση mRNA της ανθρώπινης αποΑ-I έγινε σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης mRNA για την GAPDH (Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) του ποντικού.

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## **A) *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΔΟΜΗΣ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I**

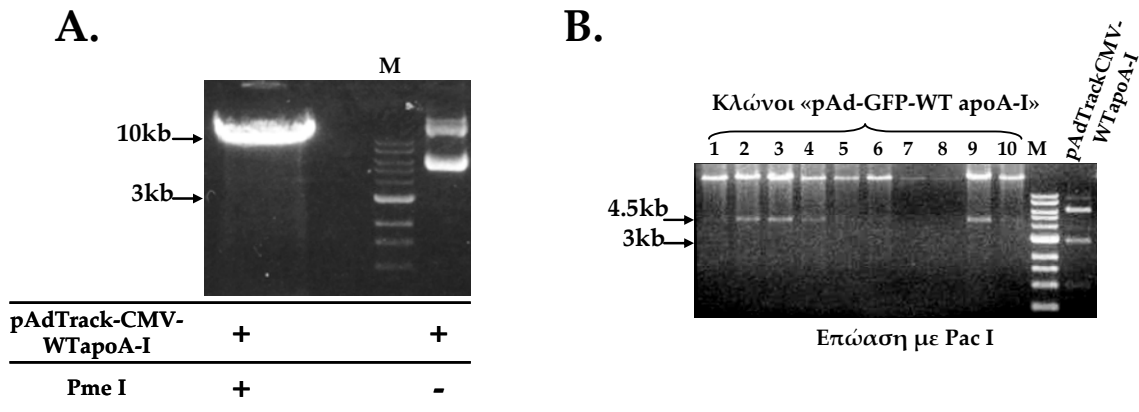
### **A1. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ LCAT ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΑ-I, *IN VIVO*.**

#### **I. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ.**

##### *Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I.*

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν την WT και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I χρησιμοποιήθηκε το σύστημα pAdEasy<sup>®</sup>, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Παράλληλα, κατασκευάστηκε και ένας κενός αδενοϊός που εκφράζει την GFP. Ο αδενοϊός αυτός χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας αρνητικού ελέγχου (negative control) στα πειράματα που ακολούθησαν.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κατασκευή του ανασυνδυασμένου αδενοϊού που φέρει το γονίδιο για την WT αποΑ-I. Συγκεκριμένα, μετά την κατασκευή του πλασμιδίου-φορέα “pAdTrack-CMV-WTapoA-I”, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι», ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή (Stratagene) για το σύστημα pAdEasy. Σύμφωνα με αυτό, κατάλληλα βακτήρια, “BJ5183-AD1”, μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο-φορέας “pAdTrack-CMV-WTapoA-I” σε γραμμική μορφή, μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PmeI (Εικόνα 24Α). Τα βακτήρια αυτά είναι δεκτικά για μετασχηματισμό με ηλεκτρικό παλμό (electrocompetent) και φέρουν τα κατάλληλα ένζυμα που επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό



**Εικόνα 24A-B.** Η διαδικασία κατασκευής του ανασυνδυασμένου αδενοϊικού πλασμιδίου “pAd-GFP-WTapoA-I”, σύμφωνα με το σύστημα pAdEasy-1 (Stratagene). A. Δημιουργία γραμμικού μορίου “pAdTrack-CMV-WTapoA-I” με πέψη του πλασμιδίου με PmeI. Ανάλυση της αντίδρασης πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης και B. Ανάλυση (screening) κλώνων μετά από τον ανασυνδυασμό του γραμμικού “pAdTrack-CMV-WTapoA-I” με το αδενοϊικό πλασμίδιο “pAdEasy-1”, έγινε με πέψη τους με PacI και ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αναγνώριση μιας ζώνης μεγέθους 4.5 kb στους κλώνους 2, 3, 4 και 9 υποδεικνύει τον επιτυχή ανασυνδυασμό και την δημιουργία του πλασμιδίου “pAd-GFP-WTapoA-I”. Στην τελευταία στήλη φαίνεται η εικόνα πέψης του πλασμιδίου “pAdTrack-CMV-WTapoA-I” με το PacI που χρησιμοποιείται ως δείγμα αρνητικού ελέγχου (negative control) για τυχόν μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Όπου M: δείκτες μοριακού βάρους.

(recombination) μορίων DNA. Από τον παραπάνω μετασηματισμό αναπτύχθηκαν αρκετές αποικίες, σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής που περιείχε καναμυκίνη, επιλέγοντας έτσι τους κλώνους που φέρουν το πλασμίδιο “pAdTrack-CMV-WTαποΑ-I” (το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη) ή ανασυνδυασμούς του με το “pAdEasy-1”, μιας και το “pAdEasy-1” από μόνο του έχει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι με τις μικρότερες σε μέγεθος αποικίες, μιας και θεωρητικά αυτοί που περιέχουν ανασυνδυασμούς με το μεγάλο μεγέθους πλασμίδιο “pAdEasy-1” (~30 kb) αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό από αυτούς που φέρουν μόνο το “pAdTrack-CMV-WTαποΑ-I” (~10 kb).

Για την επιλογή των κλώνων που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια έγινε ανάλυση απομονωμένων κλώνων (single colonies), οι οποίοι μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PacI, απελευθερώνουν μια ζώνη μεγέθους 3 kb ή 4.5 kb, ενδεικτικό του επιτυχούς ανασυνδυασμού των πλασμιδίων. Στην περίπτωση της WT αποΑ-I, βρέθηκαν 4 θετικοί κλώνοι, που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο “pAd-GFP-WTαποΑ-I” (**Εικόνα 24B**) από τους οποίους επιλέχθηκε ο υπ’ αριθμόν 9 για την κατασκευή αδενοϊών που να εκφράζουν την WT αποΑ-I.

Η δημιουργία των αδενοϊών που εκφράζουν την WT αποΑ-I έγινε με διαμόλυνση (transfection) ποσότητας 15 μg του πλασμιδίου “pAd-GFP-WTαποΑ-I” σε γραμμική μορφή, μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο PacI (εικόνα 1B), σε καλλιέργειες κυττάρων 911 σε φλάσκες T-25. Την δημιουργία των ανασυνδυασμένων αδενοϊών ακολούθησαν τα βήματα πολλαπλασιασμού και καθαρισμού των αδενοϊικών σωματιδίων, όπως αυτά περιγράφονται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Με



παρόμοιο τρόπο κατασκευάστηκαν και οι υπόλοιποι αδενοϊοί που αναφέρονται στην παρούσα διατριβή.

Για την εκτίμηση του τίτλου κάθε αδενοϊού έγινε η δοκιμασία σχηματισμού μολυσματικών πλακών (plaque assay) σε κύτταρα 911. Ανάλογα με τον αριθμό των μολυσματικών πλακών που σχηματίστηκαν στη μονοστοιβάδα των κυττάρων, υπολογίστηκε ο αριθμός μολυσματικών σωματιδίων (pfu, plaque forming unit) ανά χιλιοστό του λίτρου (ml) αδενοϊικού διαλύματος (stock), με την μορφή pfu/ml. Συγκεκριμένα για τους αδενοϊούς “Ad-GFP-αποA-I WT” μετρήθηκαν 29 μολυσματικές πλάκες στην αραιώση  $2 \times 10^{-10}$  ml. Με τους κατάλληλους υπολογισμούς ο τίτλος των αδενοϊών για την WTαποA-I εκτιμήθηκε ως  $1.45 \times 10^{11}$  pfu/ml.

Στον **Πίνακα III** φαίνονται τα αποτελέσματα της τιτλοδότησης των αδενοϊών που κατασκευάστηκαν.

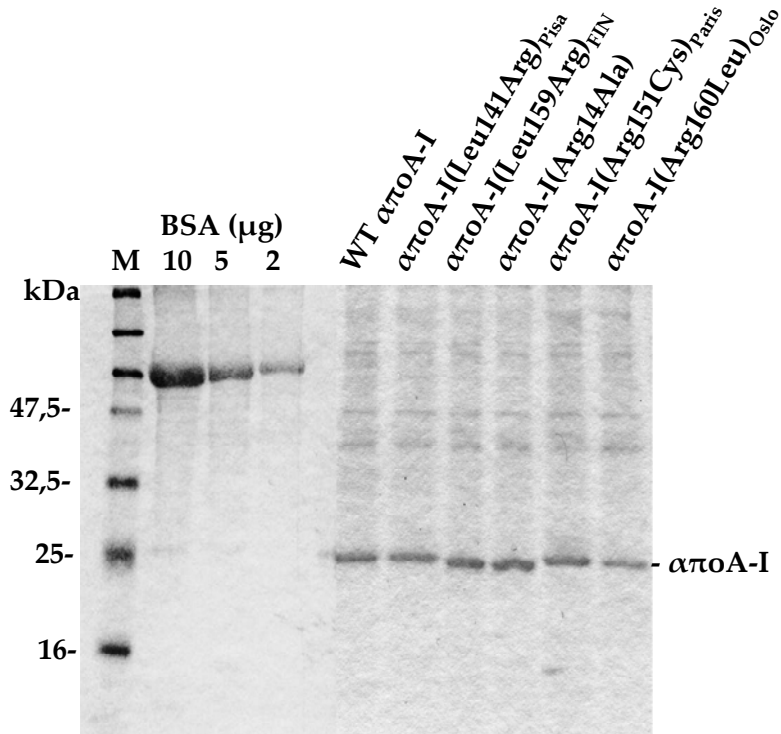
**ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ.** Τιτλοδότηση των ανασυνδυασμένων αδενοϊών που κατασκευάστηκαν και εκφράζουν μορφές της αποΑ-I ή μόνο την πρωτεΐνη GFP

<b>Ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί</b>	<b>Τίτλος (pfu/ml)</b>
Ad-GFP	$1.5 \times 10^{11}$
Ad-GFP-αποΑ-I WT	$1.45 \times 10^{11}$
Ad-GFP-αποΑ-I(Leu141Arg) <sup>Pisa</sup>	$1.25 \times 10^{11}$
Ad-GFP-αποΑ-I(Leu159Arg) <sup>FIN</sup>	$2.5 \times 10^{11}$
Ad-GFP-αποΑ-I(Arg149Ala)	$1.15 \times 10^{11}$
Ad-GFP-αποΑ-I(Arg151Cys) <sup>Paris</sup>	$1.2 \times 10^{11}$
Ad-GFP-αποΑ-I(Arg160Leu) <sup>Oslo</sup>	$2.1 \times 10^{11}$
Ad-GFP-αποΑ-I(Leu178Pro)	$2.2 \times 10^{11}$

***Πρωτεϊνική έκφραση και έκκριση των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I σε κύτταρα HTB-13.***

Για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης και η έκκριση των διαφόρων μορφών αποΑ-I που φέρουν και εκφράζουν οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που κατασκευάστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HTB-13. Τα κύτταρα αυτά μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που φέρουν τα γονίδια για την WT και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I. Η μόλυνση έγινε με πολλαπλότητα μόλυνσης (MOI: multiplicity of infection) ίση με 10, δηλαδή 10 μολυσματικές μονάδες αδενοϊών ανά κύτταρο. Ανάλυση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων έπειτα από 24 ώρες επώασης, με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE), έδειξε ότι τόσο η WT αποΑ-I όσο και οι μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> εκφράζονται και εκκρίνονται στο θρεπτικό μέσο σε παρόμοια επίπεδα (**Εικόνα 25**). Χρησιμοποιώντας ως πρότυπα δείγματα (standards) ποσότητες της πρωτεΐνης BSA που αναλύθηκαν παράλληλα με τα δείγματα του θρεπτικού μέσου, και με εκτίμηση της πυκνότητας μέσω ψηφιακής σάρωσης (scanning densitometry) για το κάθε δείγμα, υπολογίστηκε ο ρυθμός έκκρισης της κάθε μορφής αποΑ-I στο θρεπτικό μέσο.

Σε ένα τυπικό πείραμα, βρέθηκε ότι η WT αποΑ-I και οι μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> εκκρίνονται σε καλλιέργειες κυττάρων HTB-13 σε παρόμοια επίπεδα με ρυθμό 25-45 μg/ml/24h (**Εικόνα 25**). Χρήση μεγαλύτερης ποσότητας αδενοϊών (MOI 20) σε HTB-13 σε καλλιέργειες σε τρυβλία P-100 αύξησε το ρυθμό παραγωγής και έκκρισης των πρωτεϊνών στα ~150 μg/ml/24h.



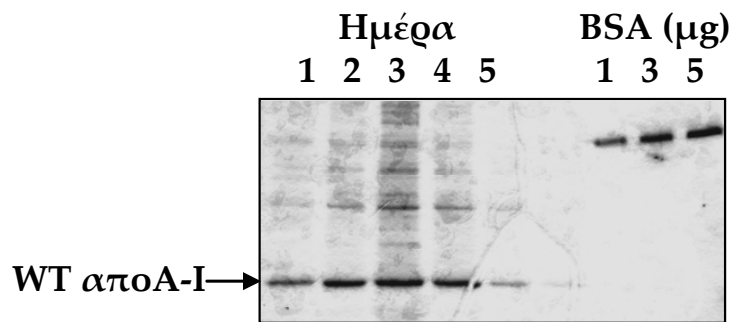
**Εικόνα 25.** Ανάλυση SDS-PAGE 100μl θρεπτικού μέσου από καλλιέργειες HTB-13 κυττάρων, σε τρυβλία P-100, μολυσμένων με αδενοϊούς (MOI 10) που εκφράζουν τις αναφερόμενες στο πάνω μέρος της εικόνας μορφές της apoA-I. Ποσότητες 2, 5 και 10 μg πρωτεΐνης BSA αναλύθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό. Όπου M: δείκτες μοριακού βάρους.

### ***Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός μορφών της αποΑ-I.***

Για να μελετηθούν οι ιδιότητες των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I σε σχέση με την WT μορφή, *in vitro*, χρειάστηκε να παραχθούν μεγάλες ποσότητες των εν λόγω πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό κύτταρα HTB-13 καλλιεργήθηκαν σε 6 κυλινδρικά δοχεία (roller bottles) και μολύνθηκαν με αδenoϊούς που εκφράζουν τις πρωτεΐνες αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslø</sub> και την WT αποΑ-I σε MOI 20. Κάθε κυλινδρικό δοχείο φέρει πληθυσμό κυττάρων που αντιστοιχεί σε περίπου  $3.6 \times 10^8$  κύτταρα κατά την ημέρα της μόλυνσης. Το θρεπτικό μέσο από τα κυλινδρικά δοχεία συλλέχθηκε κάθε μέρα για 5 μέρες και αντικαταστάθηκε με φρέσκο θρεπτικό μέσο όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Συνολικά, συλλέχθηκε 1,5 L θρεπτικού για κάθε μορφή της αποΑ-I από το οποίο απομονώθηκε η κάθε πρωτεΐνη όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι».

Συγκεκριμένα, για την WT μορφή της αποΑ-I, συλλέχθηκε το θρεπτικό μέσο από 6 κυλινδρικά δοχεία μετά από επώαση για 24 ώρες και για 5 μέρες. Ως ένα πρώτο βήμα ελέγχου της ποσότητας και της ποιότητας έκφρασης της πρωτεΐνης αποΑ-I, δείγμα 100 μl από το θρεπτικό μέσο κάθε ημέρας αναλύθηκε με SDS-PAGE. Στην **Εικόνα 26** φαίνεται η ποσότητα της WT αποΑ-I που υπήρχε στο κάθε δείγμα, ανά ημέρα συλλογής. Φαίνεται ότι η έκφραση της αποΑ-I αυξάνεται κάθε ημέρα μέχρι την ημέρα 3 ενώ υπάρχει έκφραση πρωτεΐνης μέχρι και 5 ημέρες μετά την μόλυνση των κυττάρων.

Το σύνολο του θρεπτικού μέσου πέρασε από φίλτρο για απομάκρυνση αιωρούμενων κυττάρων και στη συνέχεια εξισορροπήθηκε έναντι διαλύματος 0.01M Tris-HCl για 3 ώρες και με αλλαγή του διαλύματος 3 φορές, υπό ανάδευση στους 4°C. Ακολούθησε το.

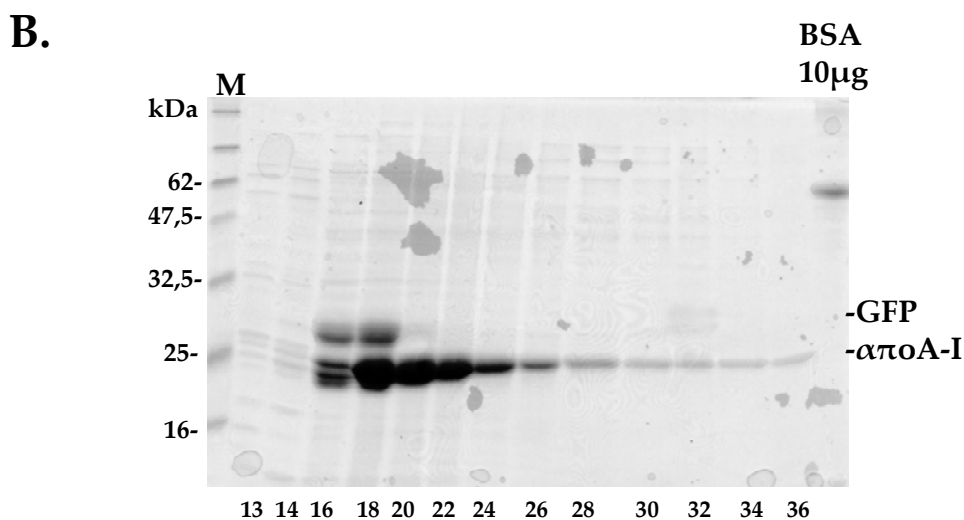
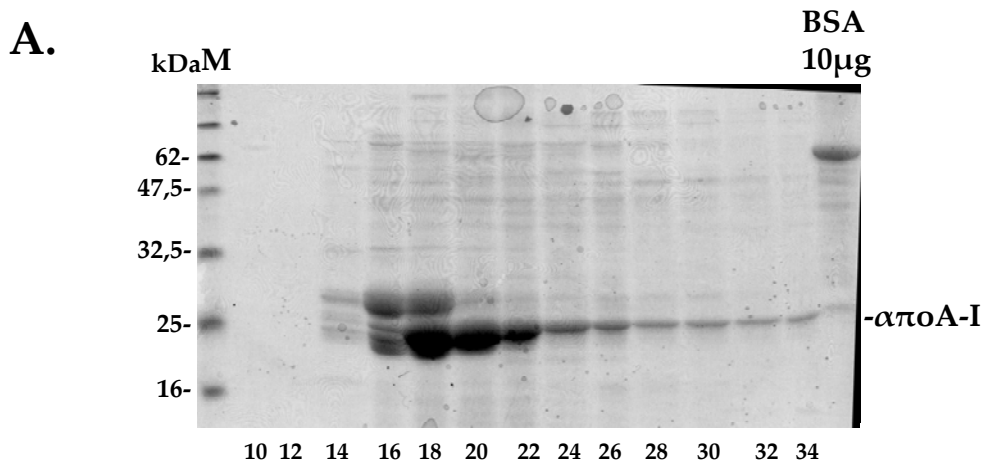


**Εικόνα 26.** SDS-PAGE ανάλυση 100 μl θρεπτικού μέσου που συλλέχθηκε από κυλινδρικά δοχεία με καλλιέργειες κυττάρων HTB-13 που μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την WT apoA-I (MOI 20). Τα δείγματα προέρχονται από συλλογή 300 ml θρεπτικού μέσου ανά ημέρα συλλογής. Δείγματα 1, 3 και 5 μg πρωτεΐνης BSA αναλύθηκαν παράλληλα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της apoA-I πρωτεΐνης.

πρώτο βήμα καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης αποΑ-I με ανάλυση μέσω στήλης ιοντοανταλλαγής. Το θρεπτικό μέσο «φορτώθηκε» στην στήλη σε δύο δόσεις, χρησιμοποιώντας 750 ml θρεπτικού μέσου κάθε φορά. Συνολικά προέκυψαν 42 κλάσματα, 3 ml το καθένα. Δείγμα 50 μl από ένα εύρος κλασμάτων (κλάσματα 10 έως 36) αναλύθηκε για την παρουσία πρωτεΐνης αποΑ-I. Στην **Εικόνα 27** φαίνεται η κατανομή της WT αποΑ-I στα κλάσματα της στήλης ιοντοανταλλαγής για κάθε δόση θρεπτικού μέσου. Φαίνεται η συν-έκλυση της πρωτεΐνης GFP που εκφράζουν οι αδενοϊοί μαζί με την αποΑ-I στα κλάσματα 14-18, ενώ στα κλάσματα 20-26 φαίνεται ότι η αποΑ-I έχει εκλουσθεί καθαρή και σε αρκετή ποσότητα. Τα κλάσματα 20 έως 26, συνολικού όγκου 21 ml, αναμείχθηκαν και συγκεντρώθηκαν μέσω φυγοκέντρησης σε κατάλληλα φίλτρα, σε όγκο μικρότερο των 3 ml.

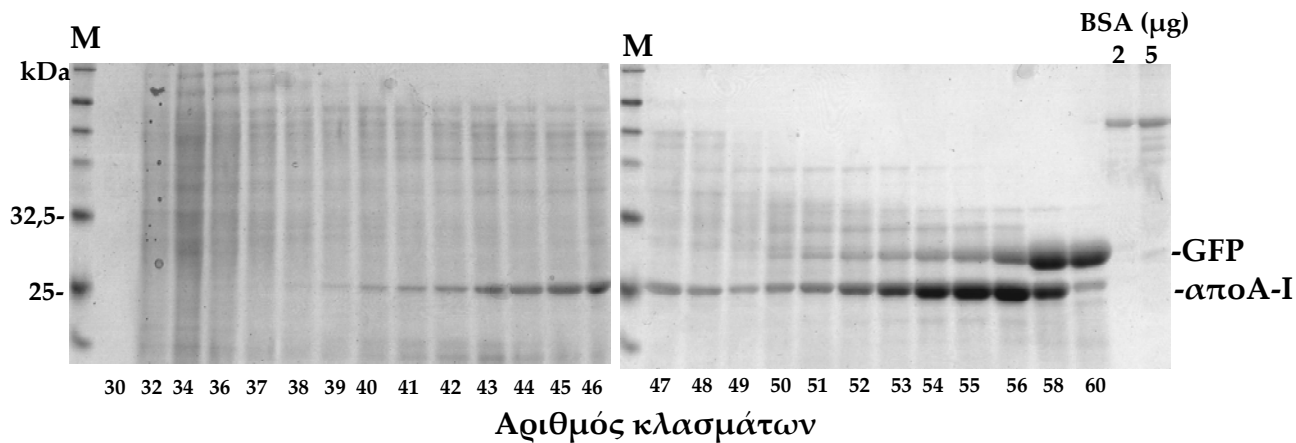
Το δεύτερο βήμα καθαρισμού και απομόνωσης της αποΑ-I είναι η ανάλυση του συγκεντρωμένου διαλύματος των κλασμάτων της στήλης ιοντοανταλλαγής μέσα από στήλη μοριακής διήθησης (Hi-Prep Sephacryl S-200). Η έκλυση έγινε με 0.15 M Ανθρακικού Αμμωνίου και προέκυψαν 92 κλάσματα των 1.2 ml το καθένα.

Για να βρεθούν τα κλάσματα στα οποία εκλούστηκε η πρωτεΐνη αποΑ-I ακολούθησε ανάλυση σε SDS-PAGE δείγματος 20 μl από τα κλάσματα 30 έως 60 της στήλης μοριακής διήθησης. Τα κλάσματα 41 έως 49 περιέχουν αποΑ-I σε διμερή μορφή ενώ τα κλάσματα 50 έως 58 φέρουν μονομερή αποΑ-I μαζί με την οποία εκλύεται και η πρωτεΐνη GFP που εκφράζεται από τους ανασυνδυασμένους αδενοϊούς (**Εικόνα 28**).



**Εικόνα 27Α-Β.** SDS-PAGE ανάλυση δείγματος 50 µl από τα κλάσματα 13 - 36 της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής (υποδεικνύονται στο κάτω μέρος) «Hi TrapQ» στην οποία αναλύθηκε θρεπτικό μέσο που περιείχε WT αποΑ-I. Τα κλάσματα 20 - 26 περιέχουν κυρίως καθαρή αποΑ-I ενώ στα κλάσματα 16 - 18 συνυπάρχει με την GFP που εκφράζεται από τους αδενοϊούς. Τα Α και Β αντιπροσωπεύουν ανάλυση δύο διαφορετικών δειγμάτων θρεπτικού μέσου όγκου 750 ml το καθένα που συλλέχθηκε μετά από επώαση HTB-13 κυττάρων μολυσμένων με αδενοϊούς που φέρουν το γονίδιο της WT αποΑ-I (MOI 20). Δείγμα 10µg πρωτεΐνης BSA αναλύθηκε παράλληλα για ποσοτικό προσδιορισμό. Όπου Μ: δείκτες μοριακού μεγέθους.





**Εικόνα 28.** Δεύτερο βήμα καθαρισμού της WT apoA-I. SDS-PAGE ανάλυση δείγματος 20  $\mu$ l από τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης μέσω της στήλης Hi-Prep Sephacryl S-200. Η apoA-I διαχωρίζεται σε δύο κορυφές, η πρώτη στα κλάσματα 40 – 49 αντιπροσωπεύει τα αυθόρμητα-σχηματιζόμενα διμερή apoA-I ενώ η δεύτερη στα κλάσματα 50 – 60 αντιπροσωπεύει την μονομερή μορφή της apoA-I η οποία εκλούεται κοντά με την GFP (κλάσματα 55 - 60). Ποσότητες 2 και 5  $\mu$ g πρωτεΐνης BSA αναλύθηκαν παράλληλα για ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Όπου M: δείκτες μοριακού μεγέθους.

Οι δύο πληθυσμοί της αποΑ-I συλλέχθηκαν χωριστά σε δύο όγκους 10.8 ml ο καθένας, και υπέστησαν λυοφιλοποίηση. Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής, η αποΑ-I σε μορφή σκόνης διατηρήθηκε στους -80°C. Για την εκτίμηση της ποσότητας της καθαρισμένης πρωτεΐνης ακολούθησε ζύγιση και επαναδιάλυση 1 mg λυοφιλοποιημένης πρωτεΐνης σε 100 μl διαλύματος 1x PBS. Δείγμα από το διάλυμα της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford. Η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης WT αποΑ-I που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή προσδιορίστηκε στα 16 mg.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε στη περίπτωση των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>. Οι ποσότητες που απομονώθηκαν για την κάθε μορφή αποΑ-I φαίνονται στον **Πίνακα IV**.

**ΠΙΝΑΚΑΣ IV.** Ποσότητες καθαρής πρωτεΐνης που απομονώθηκαν για τις *in vitro* μελέτες, από κάθε μορφή αποΑ-I.

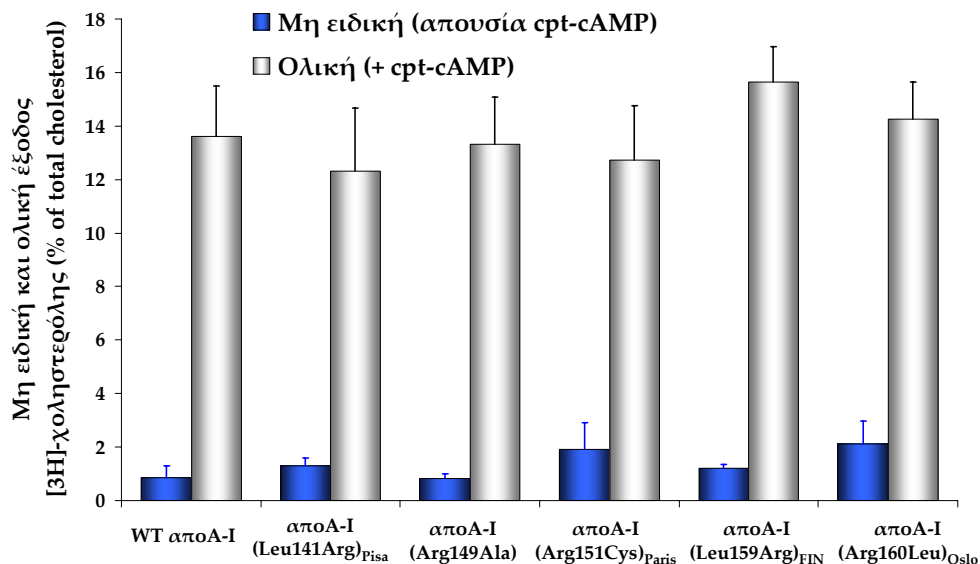
<b>Μορφή απολιποπρωτεΐνης Α-I</b>	<b>Ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης</b>
WT αποΑ-I	16 mg
αποΑ-I(Leu141Arg) <sup>Pisa</sup>	31 mg
αποΑ-I(Leu159Arg) <sup>FIN</sup>	25 mg
αποΑ-I(Arg149Ala)	18 mg
αποΑ-I(Arg151Cys) <sup>Paris</sup>	21 mg
αποΑ-I(Arg160Leu) <sup>Oslo</sup>	30 mg

## II. *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I

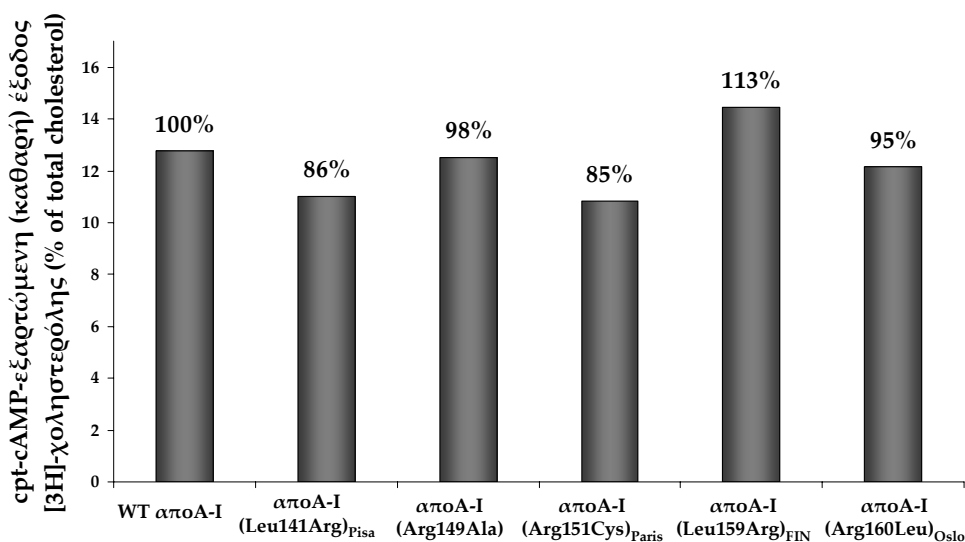
### *ABCA1-εξαρτώμενη έξοδος χοληστερόλης (cholesterol efflux).*

Μια από τις ιδιότητες της αποΑ-I που μελετήθηκαν είναι η ικανότητά της να επάγει την έξοδο χοληστερόλης μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 (ATP binding cassette class A1). Για να μελετηθεί η ικανότητα των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I να επάγουν έξοδο χοληστερόλης σε σύγκριση με την WT αποΑ-I, χρησιμοποιήθηκαν J774 κύτταρα (μακροφάγα κύτταρα ποντικού). Τα κύτταρα J774 επώαστηκαν με το ανάλογο του cAMP, crt-cAMP, το οποίο επάγει την έκφραση του ABCA1 (Le Goff et al. 2006). Τα κύτταρα και στις δύο συνθήκες επώαστηκαν με 1  $\mu$ M καθαρής πρωτεΐνης αποΑ-I (WT ή μεταλλαγμένες μορφές) στο θρεπτικό μέσο, για 4 ώρες, πριν μετρηθεί η ποσότητα της χοληστερόλης που εξήλθε από τα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο. Η καθαρή crt-cAMP-εξαρτώμενη έξοδος χοληστερόλης από τα κύτταρα J774 υπολογίστηκε από την διαφορά των τιμών εξόδου χοληστερόλης που βρέθηκαν από κύτταρα που επώαστηκαν με το ανάλογο του cAMP από τις τιμές εξόδου χοληστερόλης από κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε το ανάλογο (**Εικόνα 29A**). Οι τιμές καθαρής εξόδου χοληστερόλης που αντιστοιχούν στην WT αποΑ-I ορίστηκαν ως 100%. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η crt-cAMP-εξαρτώμενη, και κατ'επέκταση ABCA1-εξαρτώμενη, έξοδος χοληστερόλης παρουσία των πρωτεϊνών αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> είναι 86%, 113%, 94%, 98% και 105% σε σχέση με την WT αποΑ-I πρωτεΐνη (**Εικόνα 29B**).

**A.**



**B.**



**Εικόνα 29A-B.** Α. Έξοδος χοληστερόλης από J774 μακροφάγα κύτταρα παρουσία της WT ή των μεταλλαγμένων μορφών της apoA-I, μετά από επώαση με το ανάλογο του cAMP (ολική έξοδος χοληστερόλης, λευκοί κύλινδροι), ή απουσία του αναλόγου (μη ειδική έξοδος, μπλε κύλινδροι). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές  $\pm$ S.D. από τρία ανεξάρτητα πειράματα που έγιναν εις διπλούν. Β. Καθαρή, crt-cAMP-εξαρτώμενη έξοδος χοληστερόλης. Αντιπροσωπεύει την διαφορά της ολικής από την μη ειδική έξοδο χοληστερόλης. Τα ποσοστά στην κορυφή των ράβδων αναφέρονται σε σχέση με την WT apoA-I, που ορίζεται ως 100%.

Συμπερασματικά, η ικανότητα των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I να επάγουν έξοδο χοληστερόλης από τα μακροφάγα J774, μέσω του μεταφορέα ABCA1 βρέθηκε να είναι φυσιολογική και παρόμοια με την ικανότητα της αγρίου τύπου αποΑ-I.

### ***Ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, in vitro.***

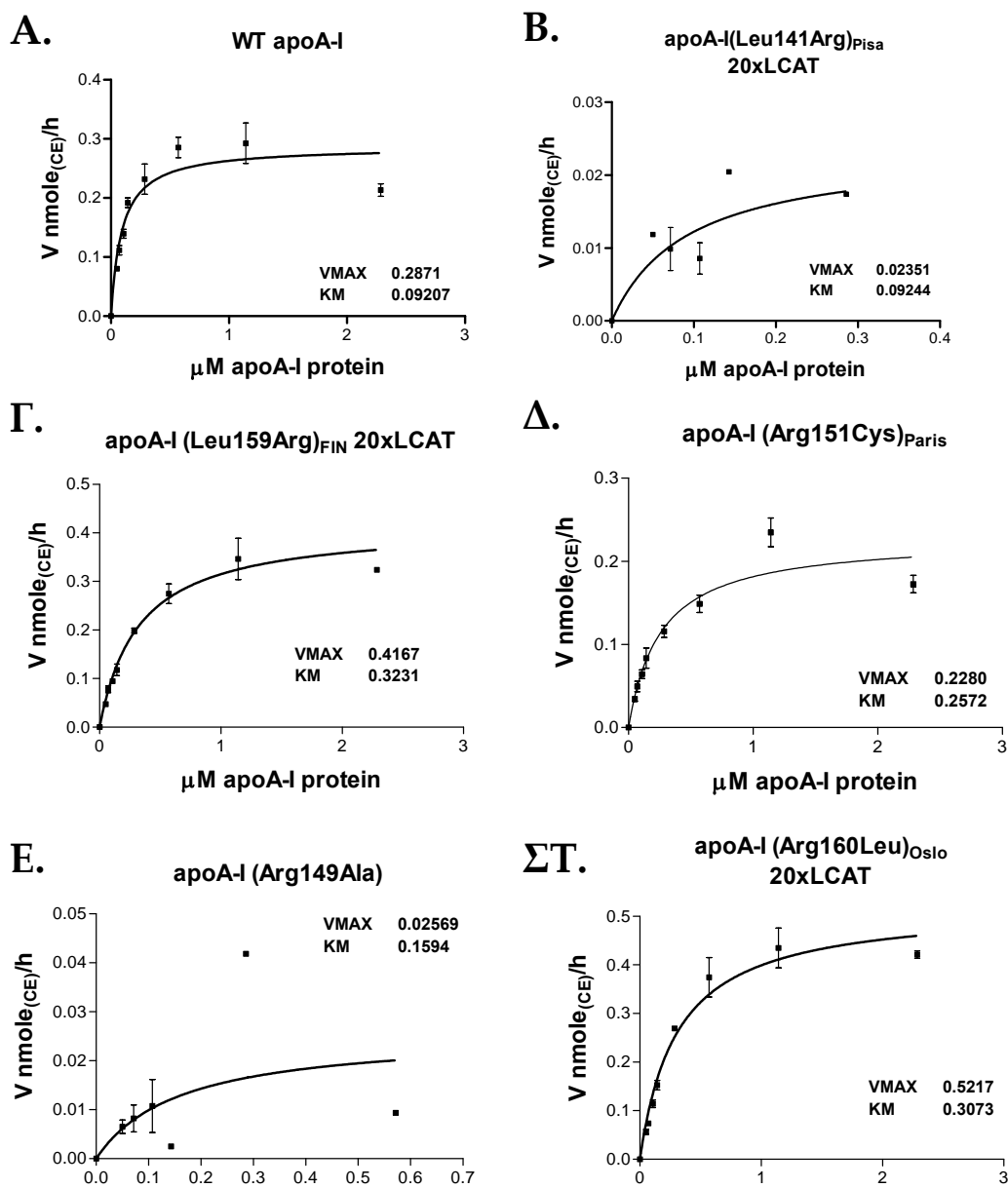
Για την μελέτη της ικανότητας των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I να επάγουν την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, χρησιμοποιήθηκαν αναδιοργανωμένα σωματίδια HDL που περιείχαν την WT ή τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>. Η ενεργότητα του ενζύμου LCAT εκφράστηκε ως ο ρυθμός παραγωγής σημασμένων εστέρων χοληστερόλης από σημασμένα με <sup>14</sup>C-χοληστερόλη αναδιοργανωμένα σωματίδια HDL (rHDL). Για την αντίδραση κινητικής για την εστεροποίηση της χοληστερόλης των rHDL σωματιδίων που περιείχαν την αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg149Ala) χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ενζύμου LCAT ίση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τα σωματίδια που περιέχουν την WT αποΑ-I. Η αρχική ταχύτητα εστεροποίησης της χοληστερόλης των σωματιδίων rHDL που περιείχαν τις μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> (όταν χρησιμοποιήθηκε η ίδια με παραπάνω συγκέντρωση ενζύμου LCAT) ήταν πολύ χαμηλή αλλά μπορούσε να αυξηθεί με ανάλογη αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο μείγμα της αντίδρασης. Βρέθηκε ότι 20 φορές αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο μείγμα της αντίδρασης που περιείχε τα σωματίδια με τις αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> ήταν αρκετή για να δώσει τιμές αρχικής ταχύτητας αντίδρασης παρόμοιες με αυτές που

λαμβάνονται για την WT αποΑ-I με την φυσιολογική συγκέντρωση ενζύμου. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά, υπολογίστηκαν οι τιμές της φαινομενικής  $V_{MAX}$  ( $V_{MAXapp}$ ), που είναι δείκτης της ταχύτητας της αντίδρασης, και της φαινομενικής  $K_M$  ( $K_{Mapp}$ ), που είναι δείκτης συνάφειας ενζύμου-υποστρώματος, για τη κάθε μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-I, και συγκρίθηκαν με αυτές που αντιστοιχούν στην WT αποΑ-I.

Η μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> παρουσίασε σημαντικά μειωμένες τιμές  $V_{MAXapp}$  και φυσιολογικές τιμές  $K_{Mapp}$  ενώ οι αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala) και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> παρουσίασαν μειωμένες τιμές  $V_{MAXapp}$  και 3,5-, 1,7- και 3,3-φορές αύξηση στις τιμές των  $K_{Mapp}$ , αντίστοιχα, σε σχέση με την WT αποΑ-I. Για την μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> οι τιμές της  $V_{MAXapp}$  βρέθηκαν σχεδόν φυσιολογικές ενώ η τιμές της  $K_{Mapp}$  παρουσιάζουν 2,8-φορές αύξηση, σε σχέση με τις τιμές για την WT αποΑ-I (**Εικόνα 30**).

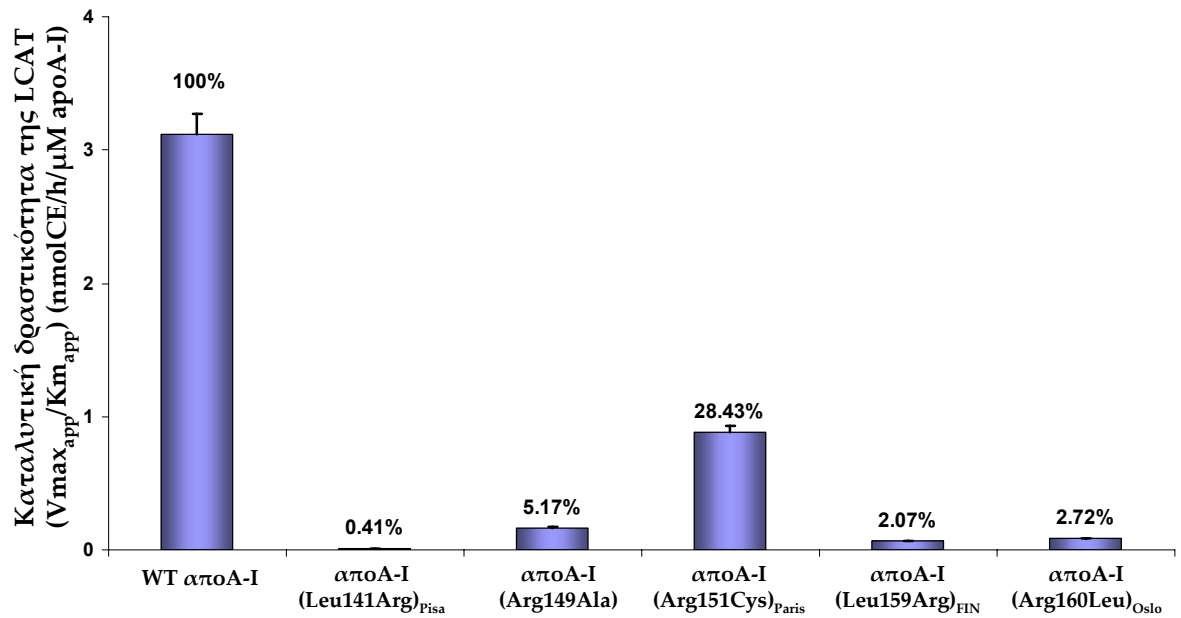
Η ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από την απολιποπρωτεΐνη Α-I, όπως εκφράζεται από τον λόγο  $V_{MAXapp}/K_{Mapp}$ , για τις αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> είναι στο 0,41%, 2,07%, 5,2%, 28,4% και 2,7%, αντίστοιχα για κάθε μετάλλαξη, σε σχέση με την αποΑ-I όπως παρουσιάζεται διαγραμματικά στην **Εικόνα 31**.

Είναι εμφανές ότι οι μεταλλάξεις προκαλούν δραματική μείωση της ικανότητας της αποΑ-I να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT, *in vitro*, που εστεροποιεί την χοληστερόλη των rHDL σωματιδίων.



**Εικόνα 30.** Ανάλυση κινητικής αντίδρασης κατά Michaelis-Menten για την δραστικότητα εστεροποίησης της χοληστερόλης από την LCAT χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος, δηλαδή rHDL που σχηματίζεται χρησιμοποιώντας διάφορες μορφές apoA-I: A. WT apoA-I, B. apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, Γ. apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, Δ. apoA-I(Arg149Ala), E. apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και ΣΤ. apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>. Υποδεικνύονται οι τιμές φαινομενικής Vmax και Km για κάθε αντίδραση, καθώς και η χρήση αυξημένης συγκέντρωσης ενζύμου, όπου χρειάστηκε.





$V_{max_{app}}$ (nmol CE/h)	$0.287 \pm 0.016$	$0.0012 \pm 0.0005$	$0.026 \pm 0.015$	$0.228 \pm 0.016$	$0.021 \pm 0.001$	$0.026 \pm 0.001$
$K_{m_{app}}$ ( $\mu$ M)	$0.092 \pm 0.020$	$0.092 \pm 0.009$	$0.159 \pm 0.095$	$0.257 \pm 0.048$	$0.323 \pm 0.043$	$0.307 \pm 0.047$

**Εικόνα 31.** Καταλυτική δραστηριότητα (catalytic efficiency) της LCAT ( $V_{MAXapp}/K_{Mapp}$ ) που αντιστοιχεί σε υπόστρωμα σωματιδίων rHDL που περιέχουν WT ή τις μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I, όπως αναγράφονται στην εικόνα. Στο κάτω μέρος αναφέρονται οι τιμές της φαινομενικής  $V_{MAX}$  και  $K_M$  από τις αντιδράσεις κινητικής  $\pm$  S.D. από τρία ανεξάρτητα πειράματα, που έγιναν εις διπλούν. Στην κορυφή των κυλίνδρων αναφέρεται η δραστηριότητα ως ποσοστό αυτής που αντιστοιχεί στην WT apoA-I, που ορίζεται ως 100%.

### III. *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I

*Επίπεδα λιπιδίων στο πλάσμα αποA-I<sup>-/-</sup> ποντικών μετά από μόλυνση με ανασυνδυασμένους αδenoϊούς που εκφράζουν την WT ή τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I*

Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της αποA-I (αποA-I<sup>-/-</sup>). Τα ποντίκια αυτά ενέθηκαν με ανασυνδυασμένους αδenoϊούς προκειμένου να εκφραστούν κυρίως στο ήπαρ τους οι αγρίου τύπου και η διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Οι δόσεις μόλυνσης κυμάνθηκαν μεταξύ 1 και 2 x 10<sup>9</sup> μολυσματικών σωματιδίων (pfu) προκειμένου να επιτευχθούν ικανοποιητικά επίπεδα ηπατικής έκφρασης των πρωτεϊνών και να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Υψηλότερες δόσεις μεταλλαγμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν για εξερεύνηση πιθανών διαφορετικών φαινοτύπων.

Ανάλυση των επιπέδων των λιπιδίων και της πρωτεΐνης αποA-I στο πλάσμα, 4 ημέρες μετά την μόλυνση, έδειξε ότι, σε σύγκριση με την WT αποA-I, τα ποντίκια που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> είχαν δραματική μείωση, σχεδόν 90%, στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα και χαμηλό λόγο εστέρων χοληστερόλης προς ολική χοληστερόλη (CE/TC), 0,44 και 0,13, αντιστοίχως. Τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων στο πλάσμα βρέθηκαν και αυτά μειωμένα. (Πίνακας V).

Στην περίπτωση ποντικών που είχαν μολυνθεί με αδenoϊούς που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I(Arg149Ala), αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα και ο λόγος CE/TC ήταν

**Πίνακας V.** Συγκεντρωτικός πίνακας των επιπέδων των λιπιδίων και της apoA-I καθώς και των ηπατικών επιπέδων apoA-I mRNA σε apoA-I<sup>-/-</sup> επίμνες, 4 ημέρες μετά από μόλυνση με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν την WT ή μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I ή την πρωτεΐνη-ελέγχου GFP, και ποντικών που δεν μολύνθηκαν με αδενοϊούς.

Εκφραζόμενη πρωτεΐνη	Ολική Χοληστερόλη (TC) (mg/dl)	Ελεύθερη Χοληστερόλη (FC) (mg/dl)	Εστέρες Χοληστερόλης (CE) (mg/dl)	CE/TC	Τριγλυκερίδια	Φωσφολιπίδια	apoA-I mRNA	apoA-I πρωτεΐνη (mg/dl)
GFP	40 ± 5	19 ± 6	21 ± 3	0.53 ± 0.01	45 ± 4	78 ± 8	-	-
WT apoA-I	190 ± 43	51 ± 15	139 ± 28	0.73 ± 0.06	76 ± 161	381 ± 85	100 ± 32	204 ± 47
apoA-I WT +hLCAT	458 ± 117	59 ± 4	398 ± 120	0.86 ± 0.04	82 ± 0.3	239 ± 42	60 ± 8	159 ± 22
apoA-I(Leu141Arg) <sup>Pisa</sup>	23 ± 0.4	11 ± 0.4	10 ± 0.8	0.44 ± 0.03	11 ± 2.8	41 ± 1	88 ± 9	17 ± 4
apoA-I(Leu141Arg) <sup>Pisa</sup> +hLCAT	184 ± 53	59 ± 16	125 ± 37	0.68 ± 0.01	41 ± 0.3	50 ± 22	91 ± 2	224 ± 7
apoA-I(Leu159Arg) <sup>FIN</sup>	16 ± 5	14 ± 4	2 ± 1	0.13 ± 0.04	25 ± 4	19 ± 6	216 ± 32	25 ± 9
apoA-I(Leu159Arg) <sup>FIN</sup> +hLCAT	224 ± 22	61 ± 8	163 ± 15	0.73 ± 0.01	53 ± 15	94 ± 30	63 ± 9	190 ± 20
apoA-I(Arg151Cys) <sup>Paris</sup>	75 ± 14	32 ± 8	42 ± 7	0.52 ± 0.08	10 ± 3.6	119 ± 12	63 ± 10	91 ± 11
apoA-I(Arg151Cys) <sup>Paris</sup> διπλάσια δόση	179 ± 51	108 ± 20	71 ± 23	0.40 ± 0.04	151 ± 28	510 ± 135	239 ± 40	223 ± 56
apoA-I(Arg151Cys) <sup>Paris</sup> +hLCAT	437 ± 89	143 ± 22	294 ± 66	0.67 ± 0.01	104 ± 29	561 ± 86	64 ± 5	199 ± 52
apoA-I (Arg149Ala)	78 ± 10	43 ± 12	35 ± 2	0.44 ± 0.06	47 ± 8	138 ± 21	115 ± 12	72 ± 26
apoA-I (Arg149Ala) +hLCAT	216 ± 67	64 ± 21	152 ± 43	0.70 ± 0.02	54 ± 6	213 ± 80	50 ± 6	188 ± 68
apoA-I(Arg160Leu) <sup>Oslo</sup>	43 ± 13	33 ± 8	10 ± 3	0.23 ± 0.01	36 ± 4	116 ± 48	117 ± 30	66 ± 31
apoA-I(Arg160Leu) <sup>Oslo</sup> +hLCAT	250 ± 47	45 ± 7	205 ± 41	0.82 ± 0.01	62 ± 11	277 ± 73	60 ± 1	127 ± 26
apoA-I(Leu178Pro)	92 ± 16	21 ± 8	71 ± 11	0.78 ± 0.06	26 ± 4	232 ± 27	134 ± 63	150 ± 35
Χωρίς μόλυνση								
apoA-I <sup>-/-</sup>	30 ± 5	11 ± 2	19 ± 5	0.63 ± 0.02	27 ± 3	7 ± 2	-	-
C57BL/6	96 ± 16	22 ± 2	74 ± 18	0.76 ± 0.05	19 ± 0.7	170 ± 20	-	-

Μέσες τιμές ± S.D. (n= 4-6)

μειωμένος, σε σχέση με τα ποντίκια που είχαν μολυνθεί με αδενοϊούς που φέρουν την WT αποA-I, αν και σε μικρότερο βαθμό από τις δύο προαναφερθείσες μεταλλαγμένες μορφές. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα επίπεδα του mRNA, η έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών αποA-I(Arg149Ala), αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> έδωσε μειωμένη χοληστερόλη και αποA-I στο πλάσμα στο 35%, 63% και 20% των τιμών για την WT αποA-I, αντίστοιχα. Επίσης, ο λόγος εστέρων χοληστερόλης προς ολική χοληστερόλη (CE/TC) για τις τρεις μεταλλαγμένες μορφές ήταν χαμηλός και συγκεκριμένα στο 0,44 για την αποA-I(Arg149Ala), 0,52 για την αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και 0,23 για την αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> (**Πίνακας V**). Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν προβληματική εστεροποίηση της χοληστερόλης του πλάσματος.

Η μόλυνση αποA<sup>-/-</sup> ποντικών με αδενοϊούς που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I(Leu178Pro), είχε ως αποτέλεσμα μικρή μείωση στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και αποA-I στο πλάσμα. Ο λόγος CE/TC του πλάσματος των ποντικών αυτών βρέθηκε παρόμοιος με αυτόν του πλάσματος ποντικών που εκφράζουν την WT αποA-I, υποδεικνύοντας ότι η εστεροποίηση της χοληστερόλης στο πλάσμα συμβαίνει σε φυσιολογικούς ρυθμούς.

Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των διαφόρων μορφών της αποA-I, στο ήπαρ των ποντικών ήταν συγκρίσιμα μεταξύ τους, όπως φάνηκε μετά από ανάλυση Northern. Τα επίπεδα mRNA της WT αποA-I ορίστηκαν ως 100% (**Πίνακας V**).

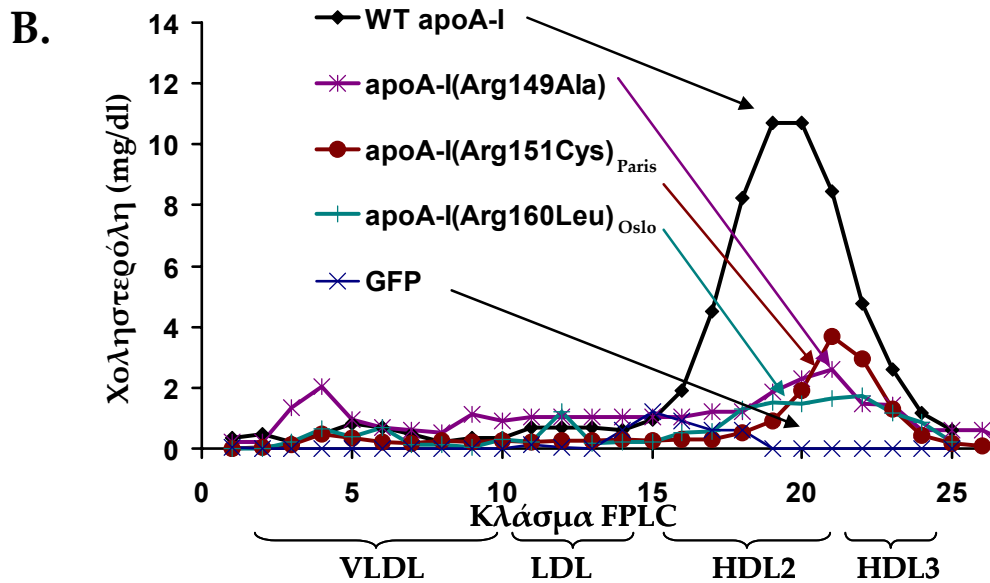
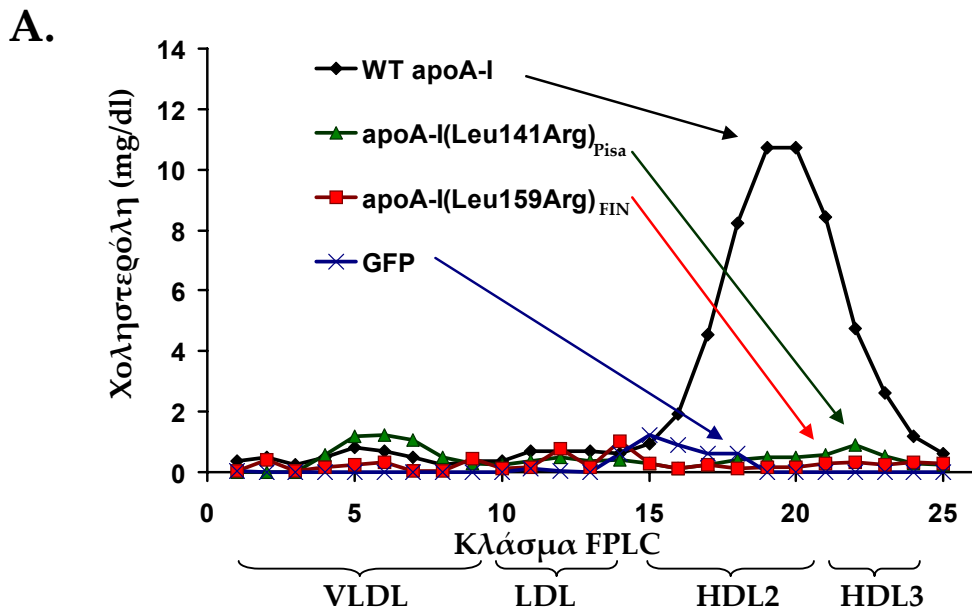
Χορήγηση αδενοϊών που εκφράζουν μόνο την GFP χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά πειράματα ελέγχου (negative control) και δεν επηρέασαν τα επίπεδα λιπιδίων στο

πλάσμα των ποντικών, σε σχέση με τα  $\text{apoA}^{-/-}$  ποντίκια που δεν μολύνθηκαν με αδενοϊούς (**Πίνακας V**).

***Κατανομή λιπιδίων μετά από ανάλυση πλάσματος μέσω μοριακής διήθησης σε FPLC.***

Η ανάλυση 17μl πλάσματος, μέσω μοριακής διήθησης FPLC, διαχώρισε τα σωματίδια του πλάσματος, με βάση το μέγεθος τους, σε VLDL, LDL και HDL. Η μέτρηση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης στα κλάσματα της FPLC έδειξε την κατανομή της χοληστερόλης στα σωματίδια του πλάσματος ποντικών που είχαν μολυνθεί με αδενοϊούς που εκφράζουν την WT και της μεταλλαγμένες μορφές  $\text{apoA-I}(\text{Leu141Arg})_{\text{Pisa}}$ ,  $\text{apoA-I}(\text{Leu159Arg})_{\text{FIN}}$ ,  $\text{apoA-I}(\text{Arg149Ala})$ ,  $\text{apoA-I}(\text{Arg151Cys})_{\text{Paris}}$  και  $\text{apoA-I}(\text{Arg160Leu})_{\text{Oslo}}$ . Η κορυφή της συγκέντρωσης ολικής χοληστερόλης στην περιοχή της HDL φαίνεται να μειώνεται δραματικά για τις μεταλλαγμένες μορφές  $\text{apoA-I}(\text{Leu141Arg})_{\text{Pisa}}$  και  $\text{apoA-I}(\text{Leu159Arg})_{\text{FIN}}$  (**Εικόνα 32A**), εν σχέση με την WT  $\text{apoA-I}$ . Σημαντική μείωση, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τις δύο προηγούμενες μεταλλαγμένες μορφές, παρατηρείται στα ποντίκια που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές  $\text{apoA-I}(\text{Arg149Ala})$ ,  $\text{apoA-I}(\text{Arg151Cys})_{\text{Paris}}$  και  $\text{apoA-I}(\text{Arg160Leu})_{\text{Oslo}}$  (**Εικόνα 32B**). Στην περίπτωση της μετάλλαξης  $\text{apoA-I}(\text{Arg151Cys})_{\text{Paris}}$  είναι ιδιαίτερα εμφανής η μετατόπιση της κορυφής στην κατανομή της χοληστερόλης προς την περιοχή HDL3 (**Εικόνα 32B**).

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι η μείωση που παρατηρήθηκε στην ολική χοληστερόλη του πλάσματος (**Πίνακας V**) οφείλεται στην μείωση της HDL χοληστερόλης (**Εικόνα 32**).



**Εικόνα 32A-B.** Κατανομή της χοληστερόλης των κλασμάτων από FPLC ανάλυση του πλάσματος από ποντίκια μολυσμένα με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν *A.* WT apoA-I, apoA-I (Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, apoA-I (Leu159Arg)<sub>FIN</sub> ή την GFP πρωτεΐνη, και *B.* WT apoA-I, apoA-I (Arg149Ala), apoA-I (Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, apoA-I (Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> ή την GFP πρωτεΐνη.

*Κατανομή των διαφόρων μορφών αποΑ-I στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρωση σε κλίση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου.*

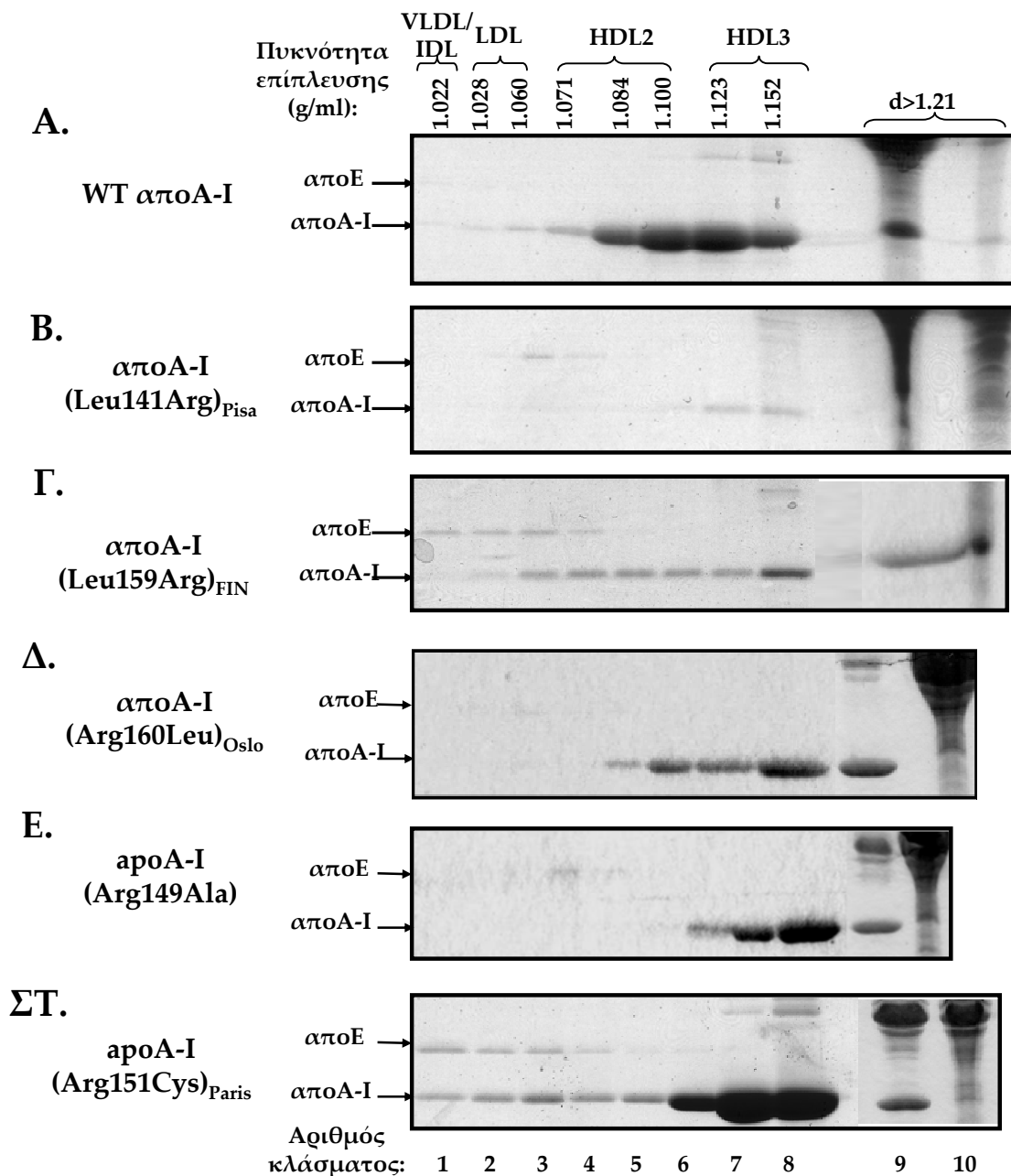
Η ανάλυση της κατανομής της αποΑ-I στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ποντικών που εκφράζουν την WT αποΑ-I ή τις αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, έγινε μετά από ανάλυση του πλάσματος με υπερφυγοκέντρωση σε κλίση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου που διαχωρίζει τις λιποπρωτεΐνες με βάση την πυκνότητα επίπλευσής τους (buoyant density).

Η WT αποΑ-I κατανέμεται κυρίως στη περιοχή των κλασμάτων 5 έως 8 που αντιστοιχεί, με βάση την πυκνότητά τους ( $1.084 < d < 1.152$ ), σε σωματίδια HDL2 και HDL3 (**Εικόνα 33Α**).

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα κατανομής της χοληστερόλης μέσω FPLC που φαίνονται στην **Εικόνα 32**, και η κατανομή της αποΑ-I στο πλάσμα από τα ποντίκια που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> φανερώνει ότι το πλάσμα περιέχει ίχνη της αποΑ-I στην περιοχή της HDL3 (πυκνότητα  $1.123 < d < 1.152$ ) (**Εικόνα 33Β**).

Έκφραση της μετάλλαξης αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> σε ποντίκια, έδωσε ανώμαλη κατανομή της πρωτεΐνης στις πυκνότητες των HDL2 και HDL3, καθώς και στην περιοχή της LDL, σε μικρές ποσότητες (**Εικόνα 33Γ**).

Σε ποντίκια που μολύνθηκαν με αδenoϊούς που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Arg149Ala) και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> τα επίπεδα της πρωτεΐνης αποΑ-I μειώθηκαν και η αποΑ-I φαίνεται να κατανέμεται στην περιοχή της HDL3 ενώ μικρότερες ποσότητες βρίσκονται και στην περιοχή της HDL2 (**Εικόνα 33Δ-Ε**).



**Εικόνα 33. Κατανομή των απολιποπρωτεϊνών.** Ανάλυση SDS-PAGE 100 μl από κάθε κλάσμα (1 - 10) μετά από υπερφυγοκέντρηση σε κλίση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου 300 μl πλάσματος apoA<sup>-/-</sup> ποντικών μολυσμένων με αδενιοϊούς που εκφράζουν Α. την WT apoA-I, Β. την apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, Γ. την apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, Δ. την apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, Ε. την apoA-I(Arg149Ala) και ΣΤ. την apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>. Στο πάνω μέρος της εικόνας σημειώνονται οι πυκνότητες των κλασμάτων, και στο κάτω μέρος ο αριθμός του κάθε κλάσματος.



Στην περίπτωση της αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> η μείωση των επιπέδων της αποA-I πρωτεΐνης στο πλάσμα είναι σαφώς μικρότερη αλλά σημαντική και η κατανομή της εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή της HDL3 ενώ μικρότερες ποσότητες βρίσκονται στην HDL2 καθώς και σε κλάσματα χαμηλότερης πυκνότητας (**Εικόνα 33ΣΤ**).

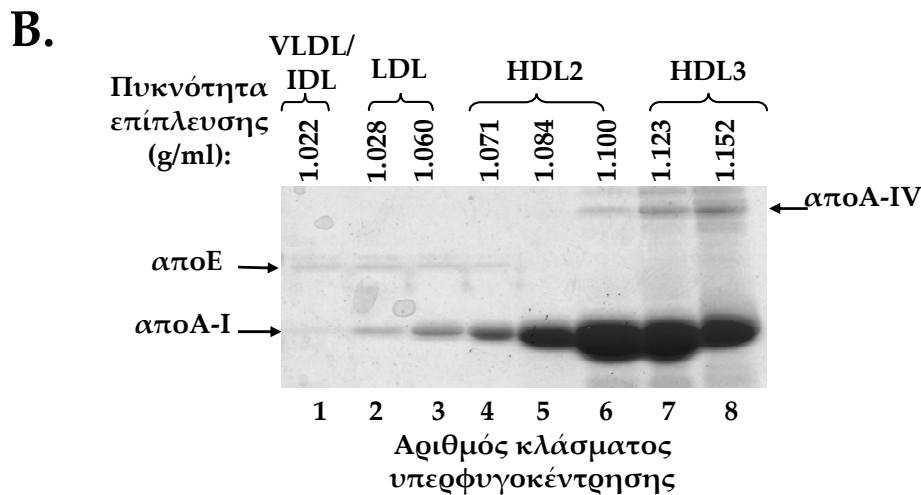
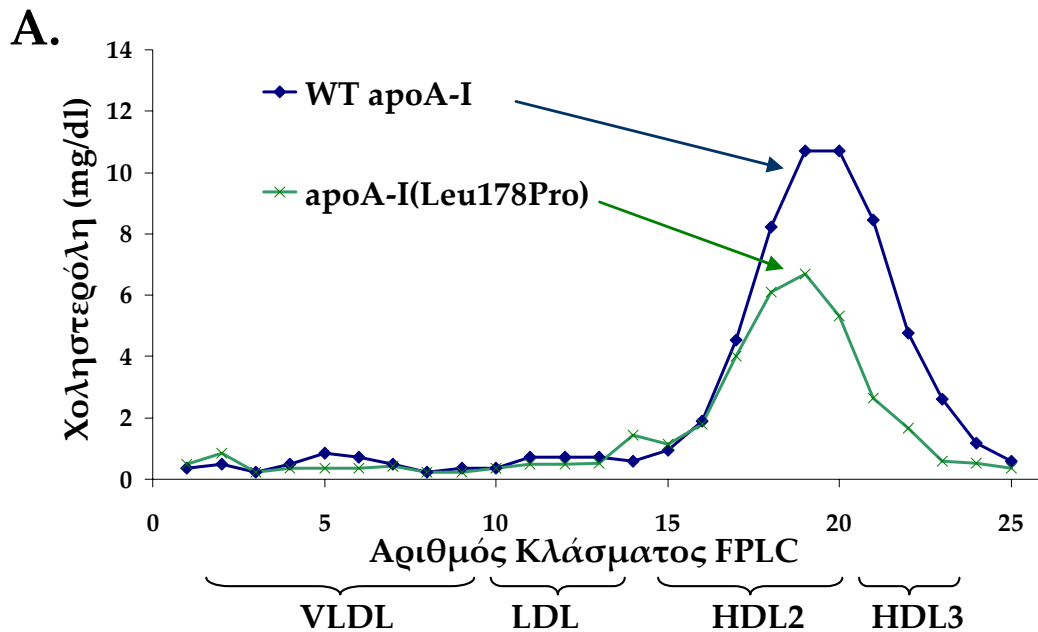
***Η μεταλλαγμένη μορφή αποA-I(Leu178Pro) δεν επηρεάζει σημαντικά τον φαινότυπο***

Στην περίπτωση της μεταλλαγμένης μορφής αποA-I(Leu178Pro), η ανάλυση των κλασμάτων του πλάσματος μετά από FPLC έδειξε ότι η χοληστερόλη κατανέμεται στην περιοχή της HDL, ακολουθώντας το πρότυπο κατανομής της WT αποA-I (**Εικόνα 34A**). Μια μικρή μετατόπιση της κορυφής συγκέντρωσης χοληστερόλης προς την περιοχή της HDL2 έδειξε ότι η μικρή μείωση της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος (**Πίνακας V**) μπορεί να σχετίζεται με μείωση των σωματιδίων HDL3 που σχηματίζει η αποA-I(Leu178Pro).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η κατανομή της αποA-I(Leu178Pro) στα κλάσματα του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρωση σε κλίση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου, ακολουθεί το πρότυπο της WT αποA-I, και εντοπίζεται στη περιοχή των κλασμάτων 5 έως 8 που αντιστοιχεί, με βάση την πυκνότητά τους ( $1.084 < d < 1.152$ ), σε σωματίδια HDL2 και HDL3 (**Εικόνα 34B**).

***Ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (EM) των HDL κλασμάτων του πλάσματος***

Για να προσδιοριστεί η μορφή των σωματιδίων που σχηματίζονται από την αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, δείγματα από τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην πυκνότητα της HDL ( $1.063 \text{ g/ml} \leq d \leq 1.210 \text{ gr/ml}$ ), μετά από



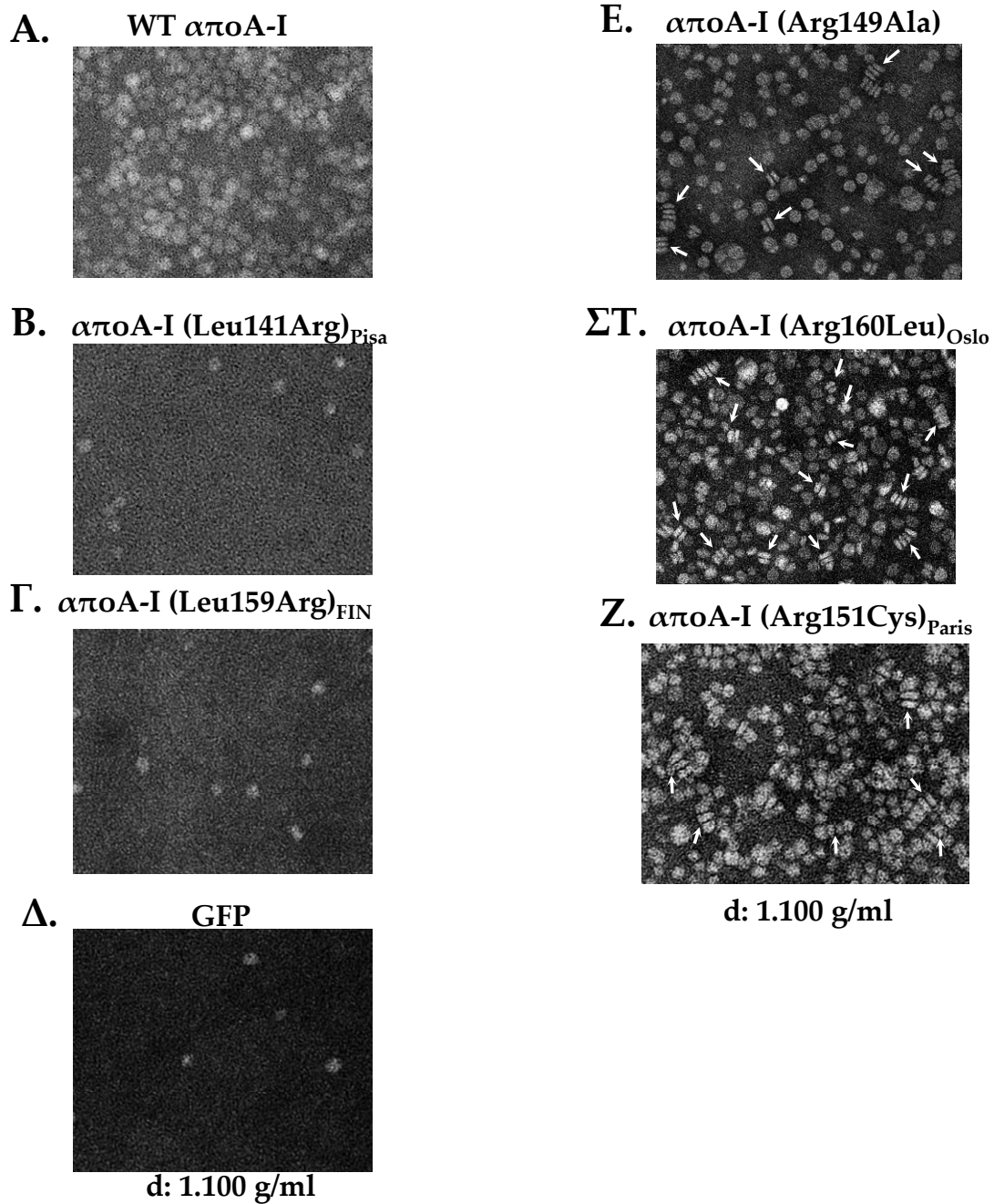
**Εικόνα 34A-B.** **A.** Κατανομή της χοληστερόλης στα FPLC κλάσματα πλάσματος *apoA*<sup>-/-</sup> ποντικών μολυσμένων με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν την WT *apoA*-I ή την *apoA*-I(Leu178Pro), όπως υποδεικνύεται από τα βέλη, **B.** Ανάλυση SDS-PAGE 100 μl από κάθε κλάσμα (1 - 10) μετά από υπερφυγοκέντρωση σε κλίση συγκέντρωσης βρωμιούχου καλίου 300 μl πλάσματος *apoA*<sup>-/-</sup> ποντικών μολυσμένων με αδενοϊούς που εκφράζουν την *apoA*-I(Leu178Pro)

ανάλυση του πλάσματος σε κλίση συγκέντρωσης KBr, αναλύθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Η ανάλυση για τα κλάσματα που προέρχονται από πλάσμα ποντικών που εκφράζουν την αγρίου τύπου ανθρώπινη αποΑ-I έδειξε ότι η HDL που σχηματίστηκε χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό σφαιρικών σωματιδίων όμοιων σε σχήμα και μέγεθος μεταξύ τους (**Εικόνα 35A**).

Ανάλυση των αντίστοιχων δειγμάτων από πλάσμα ποντικών που εκφράζουν την αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> ή την αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> έδειξε ότι παρουσία των μεταλλαγμένων αυτών μορφών σχηματίστηκαν ελάχιστα σφαιρικά σωματίδια, παρόμοια σε σχήμα, μέγεθος και αριθμό με αυτά που παρατηρήθηκαν μετά από ανάλυση πλάσματος ποντικών που εκφράζουν μόνο την πρωτεΐνη ελέγχου GFP (**Εικόνα 35B-Δ**). Τα σωματίδια αυτά περιείχαν αποΕ όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας (Chroni et al. 2005a).

Στην περίπτωση των μεταλλαγμένων μορφών αποΑ-I(Arg149Ala) και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> τα κλάσματα της HDL περιέχουν μείγμα σφαιρικών και δισκοειδών σωματιδίων (**Εικόνα 35E,ΣΤ**). Η HDL στο πλάσμα ποντικών που εκφράζουν την αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> περιέχει μικρό αριθμό δισκοειδών σωματιδίων ενώ τα σφαιρικά σωματίδια που σχηματίζονται εμφανίζουν ανώμαλο σχήμα (**Εικόνα 35Z**), εν σχέση με τα σφαιρικά σωματίδια που σχηματίζονται από την WT αποΑ-I (**Εικόνα 35A**). Τα δισκοειδή σωματίδια στις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται να σχηματίζονται από στοίβες 2-5 σωματιδίων σε σχήμα δίσκου.



**Εικόνα 35.** Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των HDL κλασμάτων από πλάσμα apoA<sup>-/-</sup> ποντικών μολυσμένων με αδενοϊούς που εκφράζουν Α. την WT apoA-I, Β. την apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, Γ. την apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, Δ. την GFP, Ε. την apoA-I(Arg149Ala), ΣΤ. την apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και Ζ. την apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>. Με βέλη σημειώνονται τα δισκοειδή σωματίδια, όπου παρουσιάζονται.

### *Ανάλυση του πλάσματος με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D)*

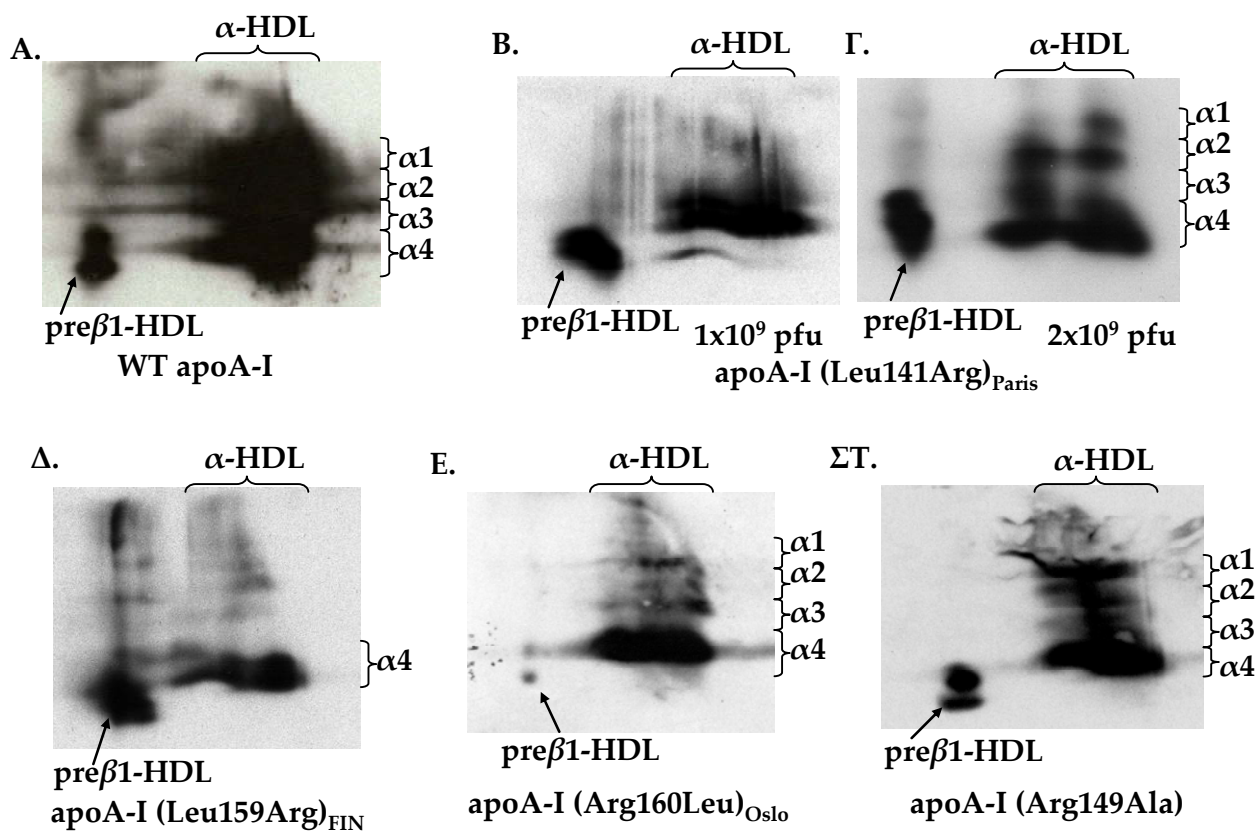
Η ηλεκτροφόρηση του πλάσματος σε δύο διαστάσεις, η πρώτη σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης και η δεύτερη σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, διαχώρισε τα σωματίδια HDL του πλάσματος με βάση το φορτίο τους και το μέγεθός τους. Ανοσοαποτύπωση (Western blot) για την ανίχνευση ανθρώπινης αποΑ-I έδειξε παρουσία της πρωτεΐνης στους διάφορους πληθυσμούς HDL σωματιδίων που δημιουργήθηκαν στο πλάσμα. Με την ανάλυση αυτή έγινε εμφανής ο σχηματισμός από την WT αποΑ-I σωματιδίων α-κινητικότητας διαφορετικού μεγέθους και φορτίου, ενώ σχηματίστηκαν και λίγα σωματίδια προ-βήτα-1 (preβ1) κινητικότητας (**Εικόνα 36Α**).

Πλάσμα από ποντίκια που εκφράζουν είτε την αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> είτε την αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> περιέχει κυρίως preβ1-HDL σωματίδια και α4-HDL σωματίδια, που εμφανίζουν υψηλή ηλεκτροφορητική κινητικότητα (**Εικόνα 36Β, Δ**). Παρόμοια εικόνα εμφανίζει και η ανάλυση πλάσματος από ποντίκια μολυσμένα με υψηλότερη δόση ( $2 \times 10^9$  pfu) αδενοϊών που εκφράζουν την αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> (**Εικόνα 36Γ**).

Σε ποντίκια μολυσμένα με αδενοϊούς που εκφράζουν την αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslø</sub> σχηματίστηκαν κυρίως σωματίδια που αντιστοιχούν στην α4-HDL με υψηλή ηλεκτροφορητική κινητικότητα, καθώς και μικρές ποσότητες preβ1-, α3- και α2-HDL σωματιδίων (**Εικόνα 36Ε**).

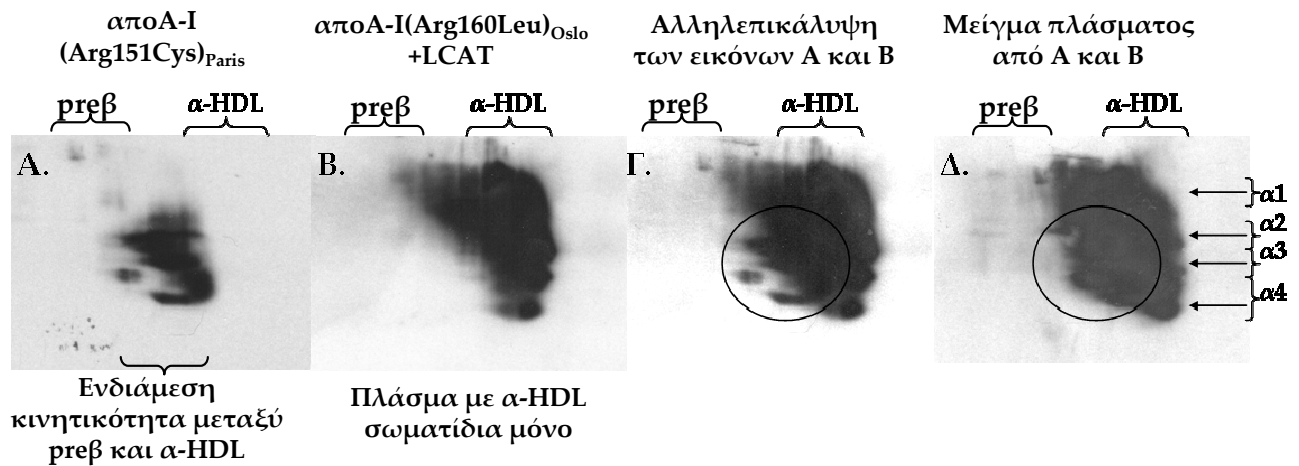
Στην περίπτωση της μετάλλαξης αποΑ-I(Arg149Ala) σχηματίστηκαν preβ1 και α4-HDL σωματίδια και μικρές ποσότητες α1-, α2- και α3-HDL σωματιδίων με μικρότερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα (**Εικόνα 36ΣΤ**).

Διαφορετική εικόνα των σωματιδίων του πλάσματος παρατηρήθηκε στην περίπτωση της μετάλλαξης αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>. Τα σωματίδια αυτά εντοπίζονται στην περιοχή



**Εικόνα 36Α-ΣΤ.** Western blot για apoA-I μετά από ανάλυση σε δύο διαστάσεις 1  $\mu$ l πλάσματος apoA-I<sup>-/-</sup> ποντικών, που έχουν μολυνθεί με  $1 \times 10^9$  pfu αδενοϊών που εκφράζουν τις μορφές apoA-I που αναφέρονται κάτω από κάθε εικόνα. Η πρώτη διάσταση διαχωρίζει τα σωματίδια του πλάσματος με βάση το φορτίο τους κινητικότητα ενώ η δεύτερη με βάση το φορτίο και το μέγεθός τους.

μεταξύ των  $\beta$  και των  $\alpha$  σωματιδίων στην πρώτη διάσταση ανάλυσης, ενώ ποικίλουν και στις ηλεκτροφορητικές κινητικότητες κατά την δεύτερη διάσταση ανάλυσης (**Εικόνα 37Α**). Για την ταυτοποίηση των εν λόγω σωματιδίων, μείγμα από πλάσμα  $\text{apoA-I}^{-/-}$  ποντικών που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή  $\text{apoA-I}(\text{Arg151Cys})_{\text{Paris}}$  και πλάσμα  $\text{apoA-I}^{-/-}$  ποντικών που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή  $\text{apoA-I}(\text{Arg160Leu})_{\text{Oslo}}$  σε συνδυασμό με την hLCAT αναλύθηκε σε δύο διαστάσεις. Όπως αναφέρεται στην συνέχεια της παρούσας διατριβής ο συνδυασμός « $\text{apoA-I}(\text{Arg160Leu})_{\text{Oslo}}+\text{hLCAT}$ » οδηγεί στο σχηματισμό  $\alpha$ -HDL (**Εικόνα 37Β**) και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου της  $\alpha$ -κινητικότητας. Η παράλληλη ανάλυση των δύο δειγμάτων (**Εικόνα 37Δ**) δίνει παρόμοια εικόνα με αυτή που δίνει η αλληλεπικάλυψη των εικόνων 13Α και 13Β (**Εικόνα 37Γ**), και ταυτοποιεί την θέση των σωματιδίων που σχηματίζει η μεταλλαγμένη μορφή  $\text{apoA-I}(\text{Arg151Cys})_{\text{Paris}}$  μεταξύ των  $\beta$  και  $\alpha$ -HDL σωματιδίων.



**Εικόνα 37Α-Δ.** Western blot για apoA-I μετά από ανάλυση σε δύο διαστάσεις 1 μl πλάσματος apoA-I<sup>-/-</sup> ποντικών, που έχουν μολυνθεί με 1 x 10<sup>9</sup> rfu αδενοϊών που εκφράζουν Α. την μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> Β. Συνδυασμό αδενοϊών για την μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και την ανθρώπινη LCAT, που σχηματίζει μόνο α-HDL στο πλάσμα. Γ. αλληλεπικάλυψη των εικόνων Α και Β δείχνει την θέση των σωματιδίων που σχηματίζει η μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> ενώ, Δ. Ανάλυση μείγματος από πλάσμα των Α και Β δίνει παρόμοια εικόνα.



#### IV. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝ-ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ LCAT ΣΤΟΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I

Τα ευρήματα από τα παραπάνω πειράματα για τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, συμφωνούν με τον κλινικό φαινότυπο των φορέων των μεταλλάξεων για τις πρωτεΐνες αυτές ο οποίος χαρακτηρίζεται από:

- Χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος και της HDL
- Επικράτηση preβ- και α4-HDL σωματιδίων
- Μειωμένη ενεργοποίηση της LCAT

Φαίνεται λοιπόν ότι η γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο αναπαράστασης και μελέτης των παθολογικών φαινοτύπων που προκαλούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις της αποΑ-I.

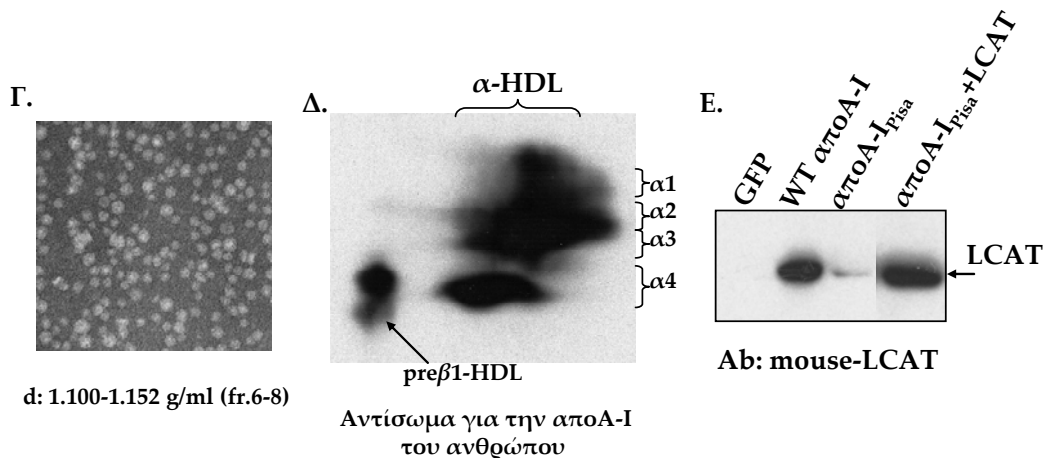
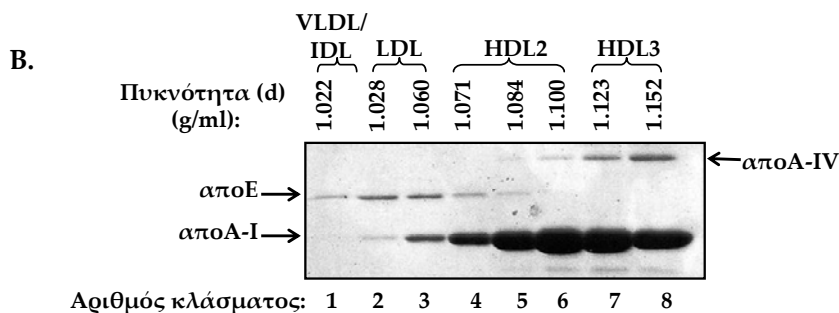
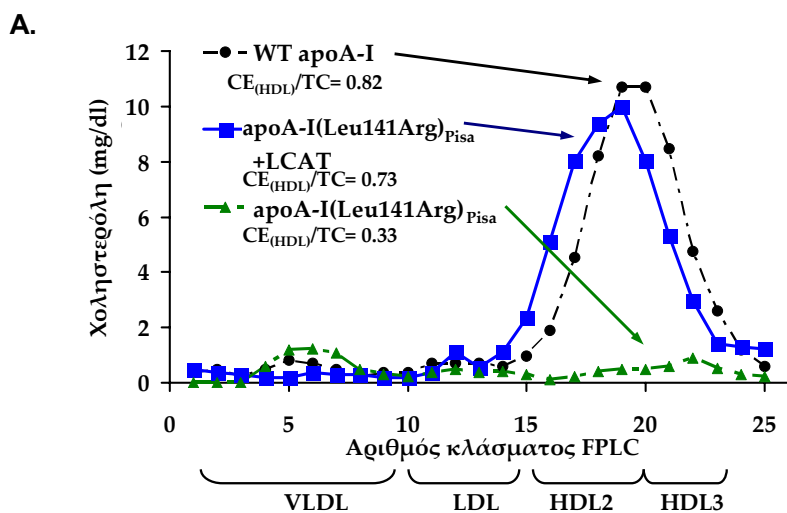
Γνωρίζοντας το ρόλο του ενζύμου LCAT στην βιοσύνθεση της HDL, τα προηγούμενα πειράματα μετατράπηκαν και δοκιμάστηκε μόλυνση των ποντικών με αδενοϊούς για κάθε μία από τις μεταλλαγμένες μορφές σε συνδυασμό, αυτή τη φορά, με αδενοϊούς που εκφράζουν την LCAT του ανθρώπου (hLCAT).

Η συνδυασμένη μόλυνση των ποντικών με αδενοϊούς για την hLCAT και κάθε μία από τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg149Ala), αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, είχε δραματικά αποτελέσματα στα επίπεδα λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα, την κατανομή της αποΑ-I, και τον σχηματισμό HDL σωματιδίων.

### **Ο συνδυασμός “αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT”**

Στην περίπτωση της αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, η χορήγηση της hLCAT προκάλεσε 13 φορές αύξηση στα επίπεδα της αποΑ-I στο πλάσμα, 8 φορές αύξηση στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και 12,5 φορές αύξηση στην εστεροποιημένη χοληστερόλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες μετρήσεις από πλάσμα ποντικών που εκφράζουν μόνο την μετάλλαξη αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> (**Πίνακας V**). Τα επίπεδα των λιπιδίων, και της αποΑ-I στο πλάσμα των ποντικών που μολύνθηκαν με τον συνδυασμό “αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT”, πλησίασαν αυτά των ποντικών που εκφράζουν την αγρίου τύπου αποΑ-I γεγονός που φανερώνει την επαναφορά του φαινοτύπου στα φυσιολογικά επίπεδα. Ο συνδυασμός “αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT” επανέφερε επίσης σε φυσιολογικά επίπεδα και το λόγο εστέρων χοληστερόλης προς ολική χοληστερόλη (CE/TC) τόσο του πλάσματος όσο και της HDL (**Πίνακας V** και **Εικόνα 38A**, αντίστοιχα). Η αύξηση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα ποντικών με τον συνδυασμό “αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT”, μπορεί να αποδοθεί εξ'ολοκλήρου στην αύξηση της HDL χοληστερόλης, το οποίο είναι εμφανές από την κατανομή της χοληστερόλης στα κλάσματα του πλάσματος, μετά από FPLC ανάλυση (**Εικόνα 38A**).

SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρωση έδειξε ότι η κατανομή της αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, παρουσία της hLCAT, εντοπίζεται στις περιοχές των HDL2 και HDL3 (κλάσματα 4-8) παρόμοια με την κατανομή της αποΑ-I σε ποντίκια που εκφράζουν μόνο την WT αποΑ-I πρωτεΐνη (**Εικόνα 33A**). Μικρές ποσότητες αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> εμφανίζονται στα μικρότερης πυκνότητας κλάσματα 2 και 3 που αντιστοιχούν στα LDL σωματίδια (**Εικόνα 38B**). Όπως φαίνεται



**Εικόνα 38A-E.** Συνδυασμός "αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>+hLCAT" σε ποντίκια. **A.** Κατανομή της χοληστερόλης του πλάσματος μετά από FPLC ανάλυση. **B.** Ανάλυση SDS-PAGE των κλασμάτων του πλάσματος από υπερφυγοκέντρηση σε κλίση βρωμιούχου καλίου. **Γ.** Ανάλυση EM της HDL. **Δ.** Ανάλυση πλάσματος (1 μl) σε δύο διαστάσεις. **Ε.** SDS-PAGE ανάλυση 0.5μl πλάσματος και Western blot για την ανίχνευση της LCAT.

από την ανάλυση μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ο συνδυασμός “αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT” επάγει το σχηματισμό μεγάλου αριθμού σφαιρικών σωματιδίων HDL σε αντίθεση με τον ελάχιστο αριθμό σωματιδίων που σχηματίζονται από την έκφραση μόνο της αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> (**Εικόνα 38Γ** και **35B**).

Στο πλάσμα των ποντικών αυτών παρατηρήθηκαν σωματίδια preβ1-, α4-, α3- και α2-HDL. Η παρουσία περίσσειας LCAT επάγει την ωρίμανση των σωματιδίων που σχηματίζει η μεταλλαγμένη μορφή αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, σε σωματίδια μικρότερης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας που φαίνεται να λείπουν όταν η μεταλλαγμένη μορφή αυτή εκφράζεται μόνη της στους ποντικούς (**Εικόνα 38Δ**).

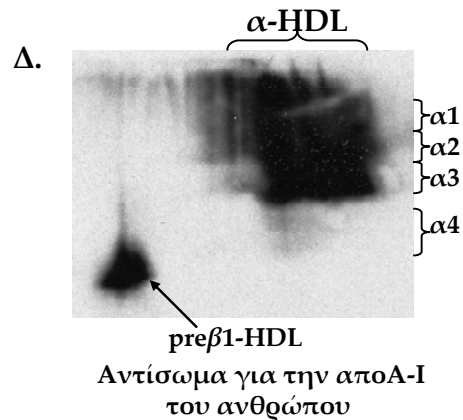
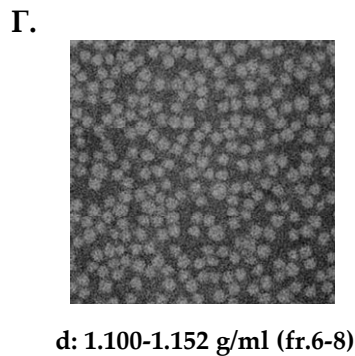
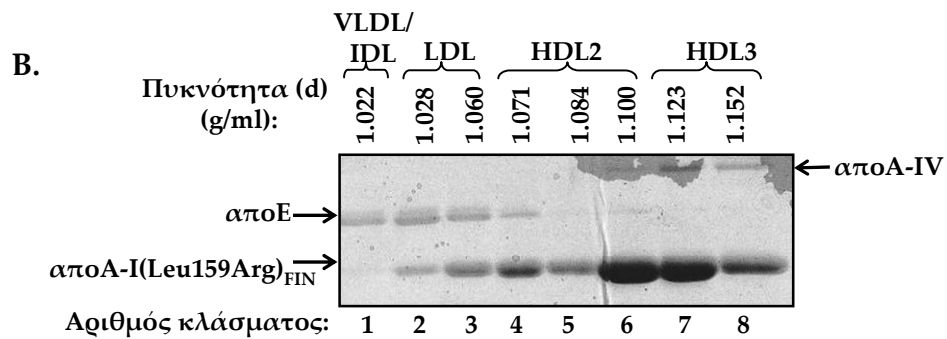
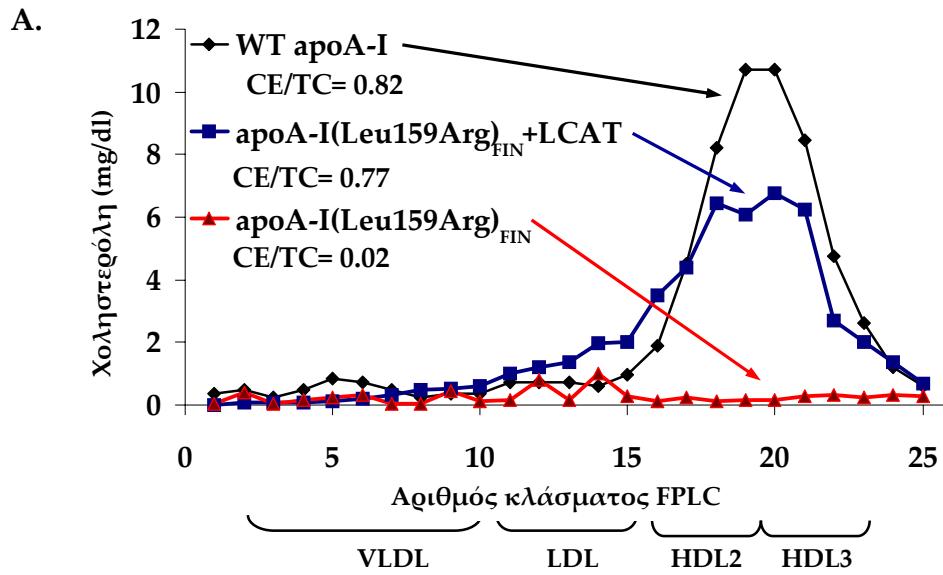
Η μάζα της LCAT στο πλάσμα των ποντικών εκτιμήθηκε με ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της LCAT του ποντικού (mLCAT) τα οποία αναγνωρίζουν παράλληλα (cross-react) και LCAT του ανθρώπου και τα οποία ήταν ευγενική προσφορά του Dr. John Parks (Wake Forest University, School of Medicine). Βρέθηκε ότι σε αποA-I<sup>-/-</sup> ποντίκια που εκφράζουν την πρωτεΐνη ελέγχου GPF, η LCAT ήταν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στο πλάσμα. Σε ποντίκια που μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την WT αποA-I η LCAT του πλάσματος είναι σε υψηλά επίπεδα, ενώ σε ποντίκια που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> η LCAT ανιχνεύθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο πλάσμα. Τα επίπεδα της LCAT στο πλάσμα των ποντικών επανήλθε σε κανονικά επίπεδα, παρόμοια αυτών που βρέθηκαν στην περίπτωση της WT αποA-I, όταν τα ποντίκια μολύνθηκαν με τον συνδυασμό “αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT” (**Εικόνα 38E**).

### **Ο συνδυασμός “αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> + hLCAT”**

Η μόλυνση αποA-I<sup>-/-</sup> ποντικών με συνδυασμό αδenoϊών που εκφράζουν την αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> και την LCAT του ανθρώπου (αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> + hLCAT) προκάλεσε 7.6 φορές αύξηση στην πρωτεΐνη αποA-I του πλάσματος, 14 φορές αύξηση στην ολική χοληστερόλη και 81 φορές αύξηση στους εστέρες χοληστερόλης (**Πίνακας V**). Ο λόγος CE/TC τόσο στο ολικό πλάσμα όσο και στην περιοχή της HDL επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα, σε σχέση με τα ποντίκια που εκφράζουν μόνο την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> (**Πίνακας V και Εικόνα 39A**).

Η αύξηση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα ποντικών με τον συνδυασμό “αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> + hLCAT”, μπορεί να αποδοθεί εξ'ολοκλήρου στην αύξηση της HDL χοληστερόλης, το οποίο είναι εμφανές από την κατανομή της χοληστερόλης στα κλάσματα του πλάσματος, μετά από FPLC ανάλυση (**Εικόνα 39A**).

SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρωση έδειξε ότι η κατανομή της αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, παρουσία της hLCAT, εντοπίζεται κυρίως στις περιοχές των HDL2 και HDL3 (κλάσματα 4-8) παρόμοια με την κατανομή της αποA-I σε ποντίκια που εκφράζουν μόνο την WT αποA-I πρωτεΐνη (**Εικόνα 33A**). Μικρές ποσότητες αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> εμφανίζονται στα μικρότερης πυκνότητας κλάσματα 2 και 3 που αντιστοιχούν στα LDL σωματίδια (**Εικόνα 39B**). Ανάλυση μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξε ότι ο συνδυασμός “αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> + hLCAT” επάγει το σχηματισμό μεγάλου αριθμού σφαιρικών σωματιδίων στην περιοχή της HDL σε αντίθεση με τον ελάχιστο αριθμό σωματιδίων που σχηματίζονται από την έκφραση μόνο της αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> (**Εικόνα 39Γ και 35Γ**)

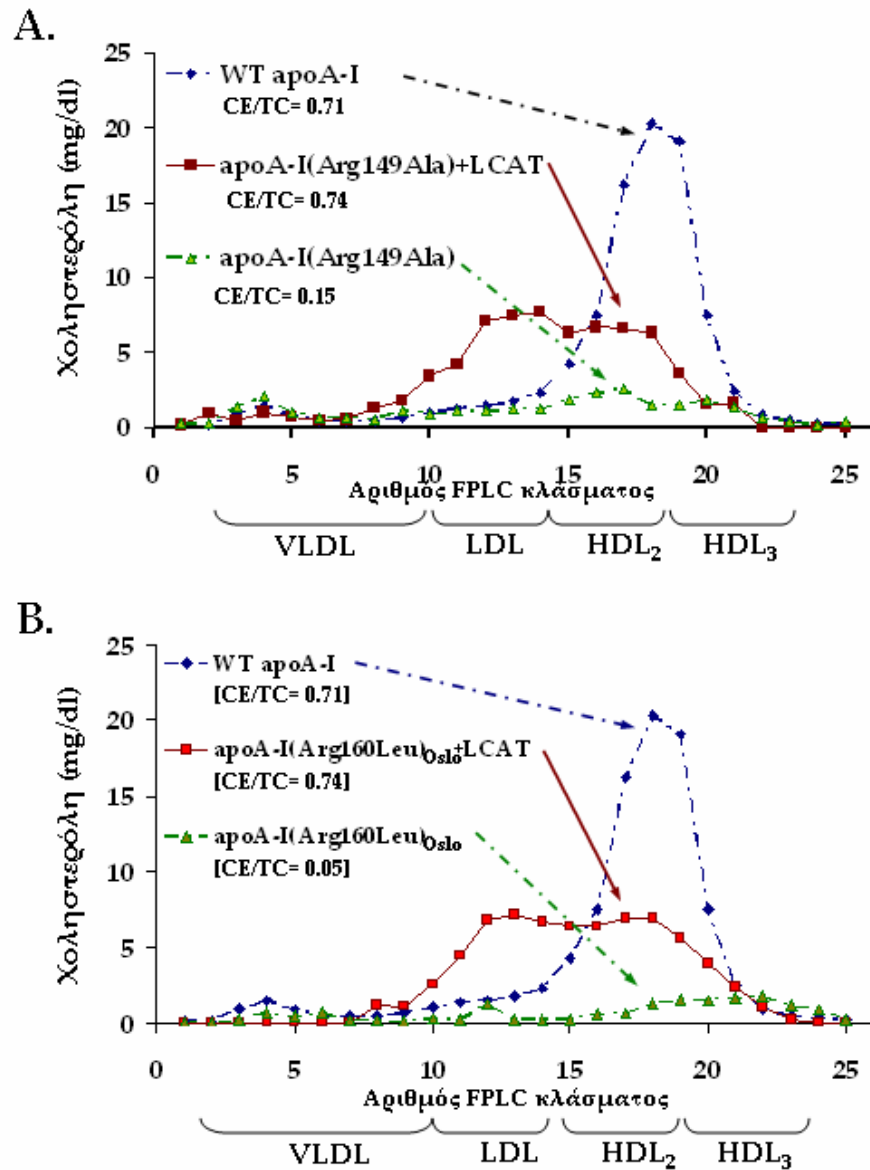


**Εικόνα 39A-Δ.** Συνδυασμός “αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>+hLCAT” σε ποντίκια.  
**A.** Κατανομή της χοληστερόλης του πλάσματος μετά από FPLC ανάλυση.  
**B.** Ανάλυση SDS-PAGE των κλασμάτων του πλάσματος από υπερφυγοκέντρηση σε κλίση βρωμιούχου καλίου.  
**Γ.** Ανάλυση EM της HDL.  
**Δ.** Ανάλυση πλάσματος (1 μl) σε δύο διαστάσεις.

Στο πλάσμα των ποντικών αυτών σχηματίζονται σωματίδια preβ1-HDL ενώ ο πληθυσμός της α-HDL αποτελείται από α3-, α2- και α1-HDL σωματίδια. Η παρουσία περίσσειας LCAT φαίνεται να επάγει την ωρίμανση των σωματιδίων που σχηματίζονται από την μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> σε σωματίδια μικρότερης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας που λείπουν όταν η μεταλλαγμένη μορφή αυτή εκφράζεται από μόνη της σε ποντικούς (**Εικόνα 39Δ**)

**Ο συνδυασμός “apoA-I(Arg149Ala) + hLCAT” και ο συνδυασμός “apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> + hLCAT”**

Η μόλυνση apoA-I<sup>-/-</sup> ποντικών με συνδυασμό αδενοϊών που εκφράζουν την apoA-I(Arg149Ala) και την LCAT του ανθρώπου (apoA-I(Arg149Ala) + hLCAT) ή την apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και την LCAT (apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> + hLCAT ) αποκατέστησε πλήρως τον παθολογικό φαινότυπο που προκάλεσε η έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών χωρίς την hLCAT. Στην περίπτωση της apoA-I(Arg149Ala) προκάλεσε 2,5 φορές αύξηση στην πρωτεΐνη apoA-I του πλάσματος, 2,8 φορές αύξηση στην ολική χοληστερόλη και 4,3 φορές αύξηση στους εστέρες χοληστερόλης (**Πίνακας V**). Στα ποντίκια “apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> + hLCAT” σημειώθηκε 1,9 φορές αύξηση της apoA-I στο πλάσμα, 5,8 φορές στην ολική χοληστερόλη και 21 φορές στους εστέρες χοληστερόλης (**Πίνακας V**). Ο λόγος CE/TC στο ολικό πλάσμα και στην περιοχή της HDL επανήλθε και για τις δύο μεταλλαγμένες μορφές σε φυσιολογικά επίπεδα, σε σχέση με τα ποντίκια που εκφράζουν την κάθε μετάλλαξη μόνο (**Πίνακας V και Εικόνα 40Α, Β**). Οι αλλαγές αυτές παρατηρήθηκαν παρά τα χαμηλότερα επίπεδα ηπατικής έκφρασης



**Εικόνα40AB.** Α. Κατανομή της χοληστερόλης στα κλάσματα της FPLC του πλάσματος από ποντίκια που μολύνθηκαν με συνδυασμό αδενοϊών που εκφράζουν την hLCAT και Α. την apoA-I(Leu149Ala), Β. την apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>. Στην εικόνα αναφέρεται ο λόγος CE/TC των κλασμάτων της HDL (αρ. 15 - 22) για κάθε δείγμα. Με διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται οι κατανομές στην περίπτωση της WT apoA-I και της κάθε μεταλλαγμένης μορφής όταν εκφράζεται μόνη της.



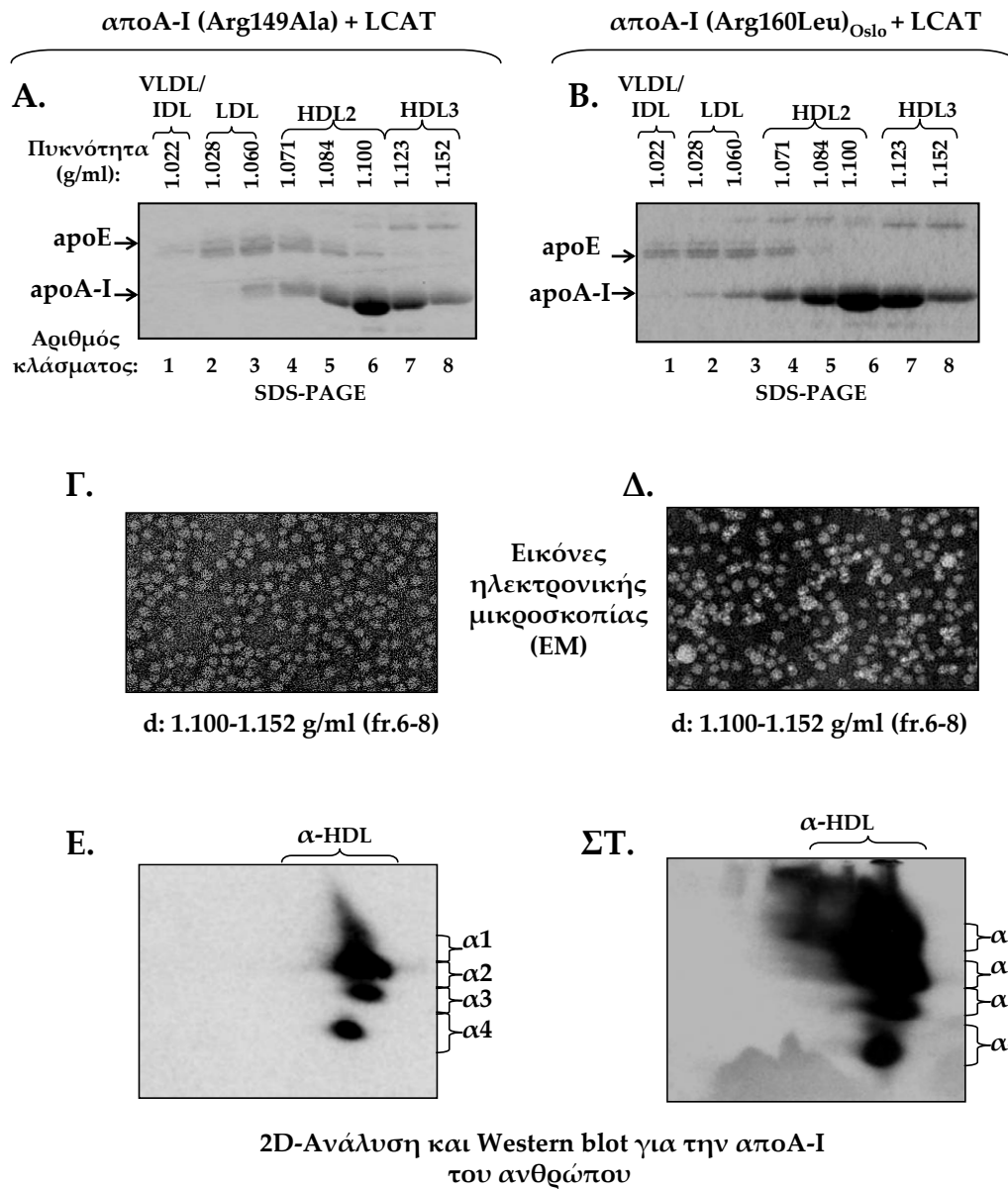
του mRNA της apoA-I στα ποντίκια “apoA-I(Arg149Ala) + hLCAT” και “apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> + hLCAT”, σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία εκφράζονται οι μεταλλαγμένες μορφές μόνες τους (**Πίνακας V**).

Η αύξηση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα ποντικών “apoA-I(Arg149Ala) + hLCAT” και “apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> + hLCAT” γίνεται εμφανής και τις μετρήσεις της χοληστερόλης στα κλάσματα του πλάσματος, μετά από FPLC ανάλυση. Η κατανομή της χοληστερόλης εμφανίζει δύο κορυφές μία στην περιοχή της HDL2 (κλάσματα 16-19) και μία στην περιοχή HDL1 (κλάσματα 12-15) που συμπίπτει με μέρος της περιοχής της LDL (**Εικόνα 40A, B**).

Υπερφυγοκέντρηση του πλάσματος και SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων έδειξε ότι η κατανομή των apoA-I(Arg149Ala) και apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> παρουσία ανθρώπινης LCAT, εντοπίζεται κυρίως στις περιοχές των HDL2 και HDL3 (κλάσματα 4-8), ενώ μικρές ποσότητες των πρωτεϊνών εμφανίζονται και στα κλάσματα μικρότερης πυκνότητας, 2 και 3, που αντιστοιχούν στα LDL σωματίδια (**Εικόνα 41A,B**), παρόμοια με την κατανομή της apoA-I σε ποντίκια που εκφράζουν μόνο την WT apoA-I πρωτεΐνη (**Εικόνα 33A**).

Ανάλυση μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξε ότι οι συνδυασμοί “apoA-I(Arg149Ala) + hLCAT” και “apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> + hLCAT” επάγουν και οι δύο το σχηματισμό μεγάλου αριθμού σφαιρικών σωματιδίων στην περιοχή της HDL ενώ απουσιάζουν τα δισκοειδή σωματίδια που σχηματίζονται από την έκφραση της κάθε μεταλλαγμένης μορφής από μόνη της (**Εικόνα 41Γ, Δ και Εικόνα 36Ε, ΣΤ** αντίστοιχα).

Στο πλάσμα των ποντικών αυτών τα preβ σωματίδια εξαφανίστηκαν ενώ ο πληθυσμός



**Εικόνα 41Α-ΣΤ.** Συνδυασμοί μόλυνσης “αποΑ-I(Arg149Ala)+hLCAT” (Α, Γ και Ε) και “αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>+hLCAT” (Β, Δ και ΣΤ) Α-Β. Κατανομή της αποΑ-I μετά από ανάλυση SDS-PAGE κλασμάτων του πλάσματος από υπερφυγοκέντρηση σε κλίση βρωμιούχου καλίου. Γ-Δ. Ανάλυση EM των σωματιδίων του πλάσματος. Ε-ΣΤ. Ανάλυση πλάσματος (1 μl) σε δύο διαστάσεις.

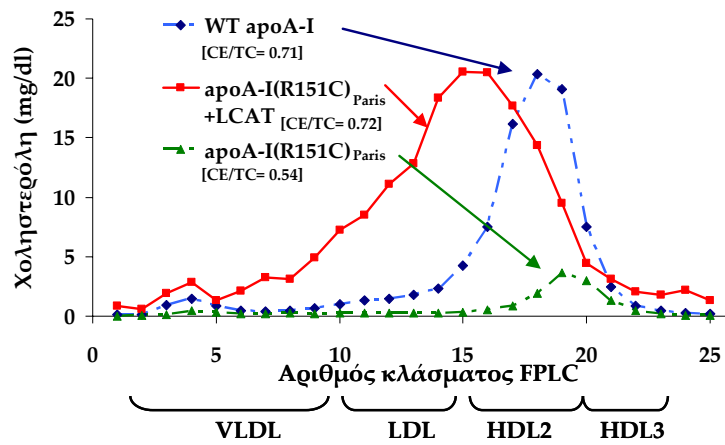
της α-HDL αποτελείται από λίγα α4-, και περισσότερα α3-, α2- και α1-HDL σωματίδια (Εικόνα 41E, ΣΤ). Η παρουσία περίσσειας LCAT φαίνεται να επάγει την ταχύτερη ωρίμανση των σωματιδίων που σχηματίζονται από τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Arg149Ala) και αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>.

### **Ο συνδυασμός “αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT”**

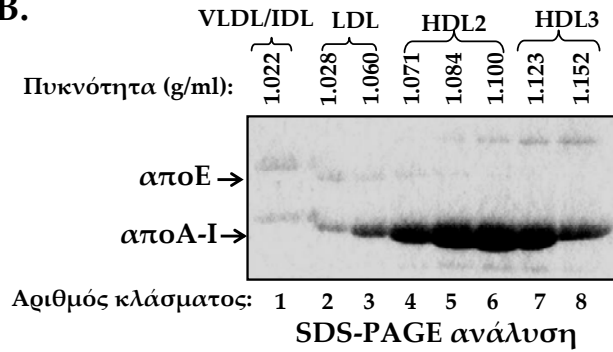
Η μόλυνση αποΑ-I<sup>-/-</sup> ποντικών με συνδυασμό αδενοϊών που εκφράζουν την αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> και την LCAT του ανθρώπου (αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT) προκάλεσε 2,2 φορές αύξηση στην πρωτεΐνη αποΑ-I του πλάσματος, 5,8 φορές αύξηση στην ολική χοληστερόλη και 7 φορές αύξηση στους εστέρες χοληστερόλης (Πίνακας V). Ο λόγος CE/TC τόσο στο ολικό πλάσμα όσο και στην περιοχή της HDL επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα, σε σχέση με τα ποντίκια που εκφράζουν μόνο την μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> (Πίνακας V και Εικόνα 42A).

Στην Εικόνα 42A φαίνεται η κατανομή της χοληστερόλης στο πλάσμα ποντικών “αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT” σε σύγκριση με την κατανομή της χοληστερόλης στο πλάσμα ποντικών που εκφράζουν είτε την μετάλλαξη αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> είτε την WT αποΑ-I. Η χοληστερόλη των ποντικών “αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT” κατανέμεται κυρίως στην περιοχή της HDL, με την κορυφή της κατανομής ελαφρώς μετατοπισμένη σε μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια, ενώ εκτείνεται μέχρι και την περιοχή της LDL. Φαίνεται ότι η αύξηση της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος των ποντικών “αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT” μπορεί να αποδοθεί σε αύξηση της χοληστερόλης κυρίως στην περιοχή της HDL.

**A.**

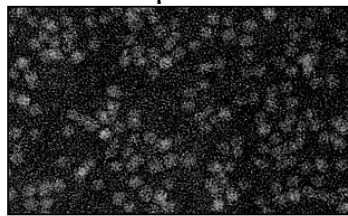


**B.**



**Γ.**

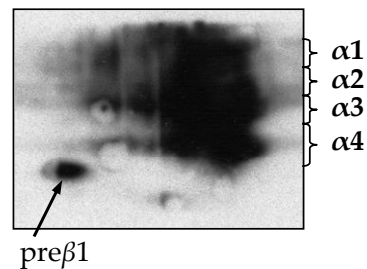
EM ανάλυση των HDL κλασμάτων



d: 1.100-1.152 g/ml(fr.6-8)

**Δ.**

2D-gel και Western blot για την apoA-I του ανθρώπου



**Εικόνα 42. Συνδυασμός “apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>+hLCAT” σε ποντίκια. A.** Κατανομή της χοληστερόλης του πλάσματος μετά από FPLC ανάλυση. Αναφέρεται ο λόγος CE/TC της HDL (αφ. 15-22) για κάθε δείγμα. **B.** Ανάλυση SDS-PAGE των κλασμάτων του πλάσματος από υπερφυγοκέντρηση σε κλίση βρωμιούχου καλίου. **Γ.** Ανάλυση EM της HDL. **Δ.** Ανάλυση πλάσματος (1 μl) σε δύο διαστάσεις.

SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρωση επιβεβαίωσε την αύξηση στα επίπεδα αποΑ-I πρωτεΐνης στο πλάσμα των ποντικών “αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT” (**Πίνακας V**) ενώ η κατανομή της αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> παρουσία της hLCAT, εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή των HDL2 και HDL3 (κλάσματα 4-8, **Εικόνα 42B**) παρόμοια με την κατανομή της αποΑ-I σε ποντίκια που εκφράζουν μόνο την WT αποΑ-I πρωτεΐνη (**Εικόνα 33A**). Μικρότερες ποσότητες αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> εμφανίζονται στα κλάσματα 2 και 3 που αντιστοιχούν στα LDL σωματίδια (**Εικόνα 42B**).

Ανάλυση μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξε ότι ο συνδυασμός “αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT” επάγει το σχηματισμό μεγάλου αριθμού σφαιρικών σωματιδίων φυσιολογικού σχήματος και μεγέθους στην περιοχή της HDL σε αντίθεση με τα σωματίδια που σχηματίζονται από την έκφραση μόνο της αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> (**Εικόνα 42Γ** και **Εικόνα 35Z**).

Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων έδειξε ότι στο πλάσμα των ποντικών “αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> + hLCAT” σχηματίζονται σωματίδια preβ1- και α- κινητικότητας σε φυσιολογική αναλογία μεταξύ τους (**Εικόνα 42Δ**) ενώ δεν φαίνεται να σχηματίζονται σωματίδια ενδιάμεσης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας όπως αυτά στο πλάσμα ποντικών που εκφράζουν μόνο την αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> (**Εικόνα 37A**).

## **A2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I ΜΕ ΤΟΝ ABCA1, IN VIVO**

### **Η ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I, ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ABCA1-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ α-HDL ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΩΝ preβ-HDL ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ, IN VIVO.**

Μια τρίτη σειρά μεταλλάξεων εστίασε στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων της αποΑ-I με τον ABCA1, η οποίες είναι σημαντικές στα αρχικά βήματα της βιογένεσης της HDL. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε, υπό την καθοδήγηση της Δρ. Αγγέλικας Χρόνη, η επίδραση σημειακών μεταλλάξεων και ελλειμματικών μορφών της καρβοξυτελικής περιοχής της αποΑ-I στην βιογένεσης της HDL, χρησιμοποιώντας γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών σε αποΑ-I<sup>-/-</sup> επίμυες.

#### Περίληπτικά

Τα επίπεδα της HDL στο πλάσμα μειώθηκαν σημαντικά σε επίμυες που μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν οποιαδήποτε από τις καρβοξυτελικές ελλειμματικές μορφές αποΑ-I[Δ(185-243)], όπου Δ(185-243) υποδεικνύει την έλλειψη της περιοχής μεταξύ των αμινοξέων 185-243 της WT αποΑ-I, ή αποΑ-I[Δ(220-243)]. Έχει βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι αυτές οι μορφές της αποΑ-I επηρεάζουν δραματικά την ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης, *in vitro*.

Αντιθέτως, σε επίμυες που εκφράζουν την ελλειμματική μορφή αποΑ-I[Δ(232-243)] ή την αποΑ-I(Glu191Ala/His193Ala/Lys195Ala) (που φέρει αντικαταστάσεις αμινοξέων) εμφανίζουν φυσιολογικά επίπεδα HDL στο πλάσμα, ενώ και η ικανότητα των μεταλλαγμένων αυτών μορφών να επάγουν ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης *in vitro*, είναι φυσιολογική, σε σχέση με την WT αποΑ-I.

Ηλεκτροφόρηση του πλάσματος σε δύο διαστάσεις και ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της HDL έδειξε ότι οι ελλειμματικές μορφές αποA-I[Δ(185-243)] και αποA-I[Δ(220-243)] οδήγησαν στο σχηματισμό, κυρίως, preβ-HDL σωματιδίων και μικρού αριθμού σφαιρικών σωματιδίων HDL, ενώ η WT αποA-I, η αποA-I[Δ(232-243)] και η αποA-I(Glu191Ala/His193Ala/Lys195Ala) οδήγησαν στο σχηματισμό σφαιρικών α-HDL σωματιδίων.

Η μελέτη αυτή παρουσιάζεται στην πρόσφατη δημοσίευση (Chroni et al. 2007) η οποία επισυνάπτεται στο τέλος της διατριβής.

## **B) ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟΑ-I ΚΑΙ ΑΠΟΣIII ΕΧ VIVO ΚΑΙ IN VIVO**

### **Κατασκευή ανασυνδυσασμένων αδενοϊών για μεταγραφικούς παράγοντες.**

Για την κατανόηση και μελέτη των μηχανισμών μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου, *in vivo*, χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυσασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού TGFβ. Σκοπός είναι η χρήση των αδενοϊών αυτών για μεταφορά των γονιδίων σε επίμυες για την *in vivo* μελέτη του ρόλου τους στην ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών και την βιογένεση της HDL.

Για την κατασκευή ανασυνδυσασμένων αδενοϊών που εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες του ανθρώπου HNF4α, T<sub>3</sub>Rβ ή RXRα χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pAd-TrackCMV-GFP-HNF4α, pAd-TrackCMV-GFP-T<sub>3</sub>Rβ, και pAd-TrackCMV-GFP-RXRα, αντίστοιχα, καθένα από τα οποία φέρει την αλληλουχία cDNA του γονιδίου του αντίστοιχου παράγοντα, πού ήταν ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Δρ. Καρδάση Δημήτριου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Οι ανασυνδυσασμένοι αδενοϊοί Ad-FLAG-Smad3, Ad-FLAG-Smad7, Ad-FLAG-Smad4 και Ad-HA-ALK5 οι οποίοι εκφράζουν τις πρωτεΐνες Smad3, Smad7, Smad4 και ALK5, αντίστοιχα, ήταν ευγενική χορηγία του Δρ. Αριστεΐδη Μουστάκα του «Ludwig Institute for Cancer Research» της Uppsala). Το «FLAG» υποδεικνύει την παρουσία ακολουθίας οκτώ αμινοξέων (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) ενώ το «HA» υποδεικνύει την παρουσία της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την αιματογλουτινίνη (Hemagglutinin)



στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Οι ακολουθίες LFAG και HA αποτελούν επίτοπους που χρησιμεύουν για καθαρισμό των πρωτεϊνών μέσω ανοσο-συγγένειας (immunoaffinity) ή ανοσοκαταβύθισης (immunoprecipitation) ή/και ανίχνευση με Western blotting.

Ο πολλαπλασιασμός και καθαρισμός των παραπάνω αδενοϊών έγινε σύμφωνα με όσα περιγράφονται σε προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής. Οι τίτλοι των αδενοϊών μετά τον καθαρισμό τους αναφέρονται στον **Πίνακα VI**.

Παρακάτω αναφέρονται προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με μερικούς από τους αδενοϊούς αυτούς τόσο σε κυτταρικές καλλιέργειες όσο και σε επίμυες, για την επιβεβαίωση της έκφρασης και της λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων αλλά και για την επίδρασή τους στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των αποΑ-I και αποCIII.

**Πίνακας VI.** Οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης των λιποπρωτεϊνών και τα αποτελέσματα τιτλοδότησής τους

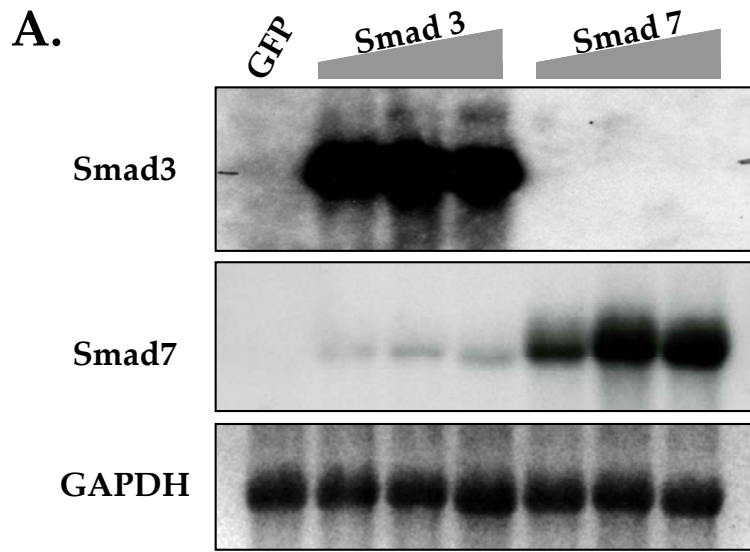
<b>Ανασυνδυασμένος αδενοϊός</b>	<b>Τίτλος (pfu/ml)</b>
Ad-GFP-HNF4α	5 x 10 <sup>9</sup>
Ad-GFP-T <sub>3</sub> Rβ	5 x 10 <sup>9</sup>
Ad-GFP-antiT <sub>3</sub> Rβ	5 x 10 <sup>9</sup>
Ad-GFP-RXRα	2 x 10 <sup>10</sup>
Ad-FLAG-Smad3	2.1 x 10 <sup>11</sup>
Ad-FLAG-Smad7	2 x 10 <sup>10</sup>
Ad-FLAG-Smad4	4 x 10 <sup>10</sup>
Ad-GFP-ARP1	1.3 x 10 <sup>10</sup>
Ad-HA-ALK5	9 x 10 <sup>10</sup>

**Επίδραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad7 στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποΑ-I και αποCIII, σε κύτταρα HepG2.**

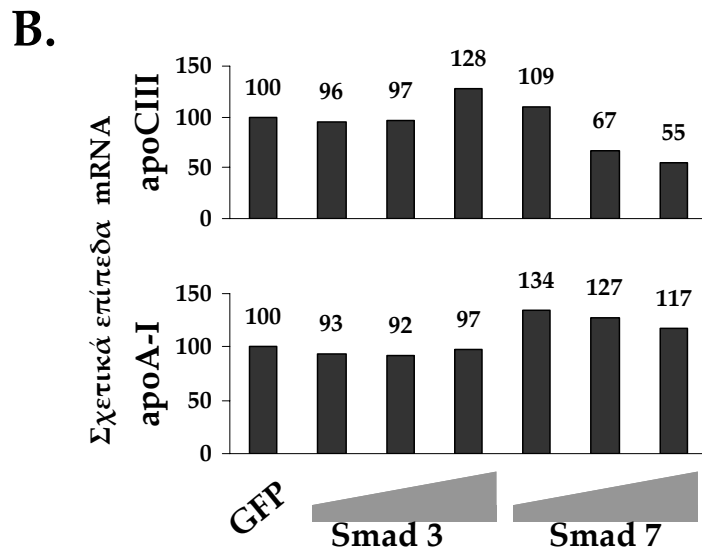
Κύτταρα HepG2 σε καλλιέργειες σε τρυβλία P-100, μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν τους παράγοντες Smad3 ή Smad7, σε MOI 5, 10 και 20, για τον κάθε αδενοϊό. Έπειτα από επώαση 48 ωρών, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση κατά Northern.

Τα επίπεδα έκφρασης των Smad3 και Smad7 ήταν σε υψηλά επίπεδα σε όλα τα κύτταρα που μολύνθηκαν με τους αντίστοιχους ανασυνδυασμένους αδενοϊούς, όπως φαίνεται από την εικόνα του σήματος των κατάλληλων ανιχνευτών μετά από ανάλυση κατά Northern (**Εικόνα 43A**). Σημαντικό στοιχείο αποτελεί η αύξηση των επιπέδων ενδογενούς Smad7 που παρατηρήθηκε στα κύτταρα HepG2 που είχαν μολυνθεί μόνο με αδενοϊούς που εκφράζουν την Smad3. Είναι γνωστό ότι η Smad3, σε συνεργασία με Smad4 επάγει την έκφραση του γονιδίου της Smad7 (Nagarajan et al. 1999). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την λειτουργικότητα των μορίων που εκφράζονται μέσω των αδενοϊών.

Για την εκτίμηση της επίδρασης των παραγόντων αυτών στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποΑ-I και αποCIII, σε κύτταρα HepG2 (ηπατοκύτταρα), αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των απολιποπρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ανιχνευτές (probes), που περιγράφονται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι», σε πειράματα ανάλυσης κατά Northern. Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα της **Εικόνας 43B**, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποΑ-I και αποCIII, δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από την υπερ-έκφραση της πρωτεΐνης



Northern blot



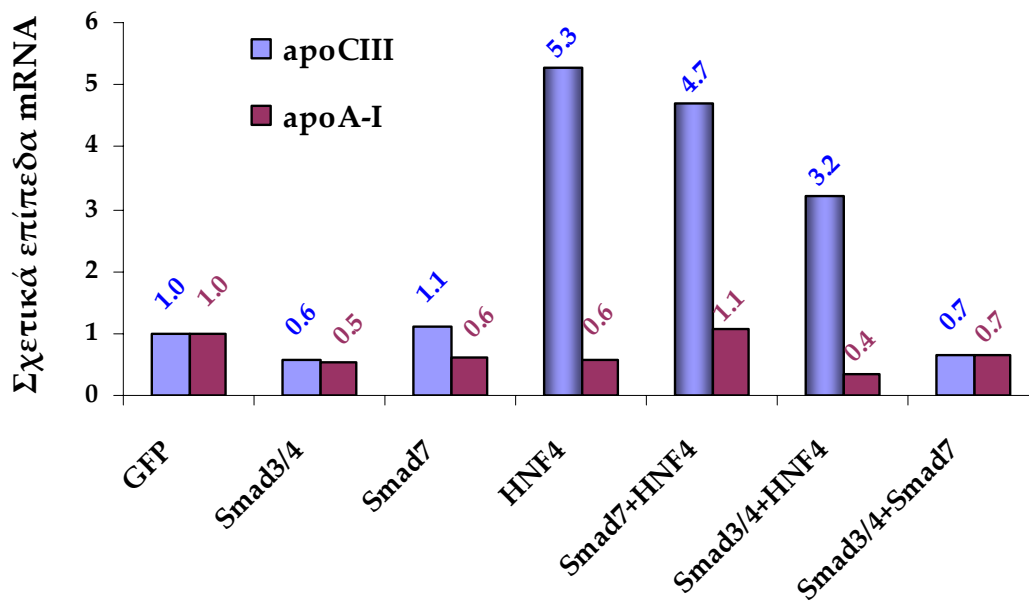
**Εικόνα 43A-B.** Αυτοραδιογραφία ανάλυσης Northern ολικού RNA από HepG2 κύτταρα μολυσμένα με αυξανόμενες δόσεις αδενοϊών (5, 10 και 20 MOI, αντίστοιχα) που εκφράζουν Smad3 ή Smad7. **A.** Χρήση ανιχνευτή (probe) για Smad3, Smad7 και GAPDH mRNA. **B.** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA για apoCIII και apoA-I, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (κύτταρα που μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν GFP) που ορίζεται στο 100%. Οι μετρήσεις έχουν κανονικοποιηθεί (normalized) με βάση τα επίπεδα mRNA της GAPDH.

Smad3 ή Smad7, σε σχέση με κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη ελέγχου, GFP (Εικόνα 43B).

**Επίδραση της πρωτεΐνης HNF4a στην έκφραση των απολιποπρωτεϊνών αποΑ-I και αποCIII, σε κύτταρα HepG2.**

Προκαταρκτικά πειράματα για την μελέτη του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα HNF4a στην μεταγραφική ρύθμιση των απολιποπρωτεϊνών Α-I και CIII, έγιναν σε κύτταρα HepG2. Παράλληλα μελετήθηκε και η επίδραση των παραγόντων Smad3, Smad4 και Smad7. Καλλιέργειες HepG2 κυττάρων σε τρυβλία P-100, μολύνθηκαν με συνδυασμό αδενοϊών που εκφράζουν τους παράγοντες Smad3 και Smad4 (Smad3/4) ή με αδενοϊούς που εκφράζουν τον Smad7 ή τέλος με αδενοϊούς που εκφράζουν τον HNF4a, σε συνολικό MOI 5, για τον κάθε αδενοϊό. Χρησιμοποιώντας συνολικό MOI των αδενοϊών Smad3/4 και Smad7, για όλα τα πειράματα, ίσο με 20, HepG2 κύτταρα μολύνθηκαν με συνδυασμούς των παραπάνω αδενοϊών με σκοπό να μελετηθεί τυχόν αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων παραγόντων στην ρύθμιση των απολιποπρωτεϊνών Α-I και CIII. Έπειτα από επώαση 48 ωρών, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση κατά Northern.

Στην **Εικόνα 44** φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των απολιποπρωτεϊνών Α-I και CIII σε κύτταρα HepG2 που έχουν μολυνθεί με τους υποδεικνυόμενους συνδυασμούς αδενοϊών μετά από ανάλυση κατά Northern, και μετά από κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων με βάση τα επίπεδα της GAPDH.



**Εικόνα 44.** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA για apoCIII και apoA-I μετά από ανάλυση κατά Northern ολικού RNA κυττάρων HepG2. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με αδενοϊούς (συνολικό MOI 20) που εκφράζουν τους παράγοντες που υποδεικνύονται στο κάτω μέρος της εικόνας. Τα επίπεδα έκφρασης των απολιποπρωτεϊνών στο δείγμα ελέγχου (GFP) ορίστηκαν ως 1.0.

Φαίνεται ότι η υπερέκφραση του HNF4α στα HepG2 κύτταρα, αύξησε τα επίπεδα έκφρασης της αποCIII 3-5 φορές, σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής της σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με τους αδενοϊούς-ελέγχου που εκφράζουν την GFP (**Εικόνα 44**). Η δραματική αυτή αύξηση στα ενδογενή επίπεδα mRNA της αποCIII των HepG2 κυττάρων από τον HNF4α, το οποίο συμφωνεί με παλαιότερες μελέτες (Talianidis et al. 1995; Kardassis et al. 1997; Ladias et al. 1992), αποδεικνύει την λειτουργικότητα της HNF4α πρωτεΐνης και του συστήματος μελέτης που χρησιμοποιήθηκε.

Η έκφραση των παραγόντων του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού, και συγκεκριμένα του συνδυασμού Smad3/4 ή του παράγοντα Smad7, σε συνδυασμό ή μη με τον παράγοντα HNF4α, δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την μεταγραφική ρύθμιση του ενδογενούς γονιδίου της αποCIII (**Εικόνα 44**). Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, και κυρίως σε πειράματα ενεργοποίησης ετερόλογων υποκινητών και μελέτης φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ Smads και HNF4α έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες Smad3, Smad4 και HNF4α εμφανίζουν συνεργιστική ενεργοποίηση του υποκινητή της αποCIII (Kardassis et al. 2000; Chou et al. 2003). Περισσότερα πειράματα είναι αναγκαία για να διευκρινιστεί ο ρόλος των παραγόντων αυτών στην μεταγραφική ρύθμιση του ενδογενούς γονιδίου της αποCIII.

Λόγω του μικρού δείγματος πειραμάτων και των μικρών μεταβολών που παρατηρούνται στα επίπεδα έκφρασης της αποA-I (**Εικόνα 44**), δεν μπορούν να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα για την επίδραση των παραγόντων αυτών στην έκφραση του γονιδίου της αποA-I, από αυτά τα δεδομένα.

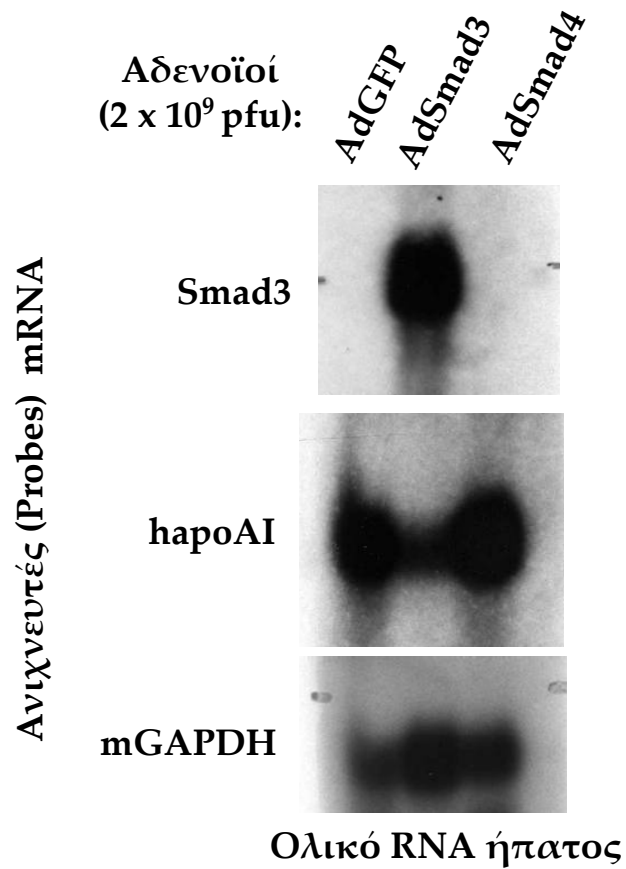
### **Η πρωτεΐνη Smad3 μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της αποΑ-I, *in vivo*.**

Για την μελέτη του ρόλου των μελών του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ στην μεταγραφική ρύθμιση της αποΑ-I, σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα σε διαγονιδιακούς επίμυες που φέρουν το γονίδιο της αποΑ-I του ανθρώπου μαζί με τις ρυθμιστικές αλληλουχίες του («Tg haroA-I») (Kan et al. 2000) αλλά και σε C57BL/6 επίμυες. Οι επίμυες μολύνθηκαν με αδενοϊούς προκειμένου να εκφραστούν, κυρίως στο ήπαρ τους, οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad3 και Smad4.

Σε αρχικά πειράματα, οι επίμυες «Tg haroA-I» που δέχτηκαν τους αδενοϊούς που εκφράζουν την πρωτεΐνη Smad3 εμφάνιζαν παθολογική εικόνα και πέθαναν 4 ημέρες μετά την μόλυνση. Οι δόσεις των αδενοϊών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $2 \times 10^9$  pfu προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα ηπατικής έκφρασης των πρωτεϊνών. Για να μελετηθεί η επίδραση της έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3 στην έκφραση της αποΑ-I, τα πειράματα επαναλήφθηκαν και οι επίμυες θυσιάστηκαν 3 ημέρες μετά την μόλυνση.

Ο ηπατικός ιστός συλλέχθηκε για την απομόνωση ολικού RNA και ακολούθησε ανάλυση κατά Northern για τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των Smad3, αποΑ-I και GAPDH (γονίδιο ελέγχου) στο ήπαρ των ζώων. Στους «Tg haroA-I» επίμυες που μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν την πρωτεΐνη Smad3, βρέθηκε ότι τα επίπεδα mRNA της Smad3 ήταν πολύ υψηλά, παρότι θυσιάστηκαν 3 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ φαίνεται να είναι σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στους επίμυες που δέχτηκαν αδενοϊούς για την πρωτεΐνη-ελέγχου GFP ή για την πρωτεΐνη Smad4 (**Εικόνα 45**). Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι στους επίμυες που εκφράζουν την Smad3 τα επίπεδα έκφρασης για την αποΑ-I μειώνονται δραματικά, τουλάχιστον 10 φορές σε σχέση με τα επίπεδα της αποΑ-I στους επίμυες που εκφράζουν την Smad4 ή την GFP (**Εικόνα 45**).





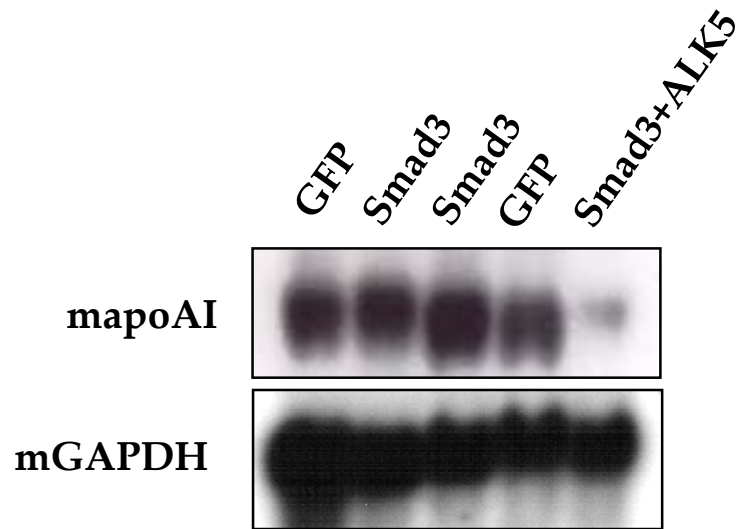
**Εικόνα 45** Αυτοραδιογραφία ανάλυσης Northern ολικού RNA ήπατος διαγονιδιακών ποντικών (Tg hapoA-I), 3 ημέρες μετά την μόλυνσή τους με αδενοϊούς που εκφράζουν Smad3 ή Smad4, ή την πρωτεΐνη-ελέγχου GFP, με δόσεις  $2 \times 10^9$  pfu. Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι ανιχνευτές για Smad3, apoA-I του ανθρώπου (hapoA-I) και GAPDH του ποντικού (mGAPDH), όπως υποδεικνύονται στην εικόνα.

Σε C57BL/6 επίμυες που μολύνθηκαν με σχετικά χαμηλή δόση αδενοϊών ( $3 \times 10^8$  pfu), προς αποφυγή του θανάτου των ζώων, η υπερέκφραση της Smad3 δεν φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της αποΑ-I του ποντικού (**Εικόνα 46**).

Δοκιμάστηκε μαζί με την Smad3 και ο υποδοχέας ALK5 (activin receptor-like kinase 5) ο οποίος είναι υποδοχέας τύπου I του TGFβ, και είναι συστατικά ενεργός (constitutively active) (Moustakas et al. 2001). Η συνέκφραση των Smad3 και ALK5 μείωσε δραματικά τα επίπεδα έκφρασης της αποΑ-I του ποντικού (**Εικόνα 46**), φανερώνοντας τον σημαντικό ρόλο του μονοπατιού σηματοδότησης του TGFβ και συγκεκριμένα της Smad3, στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της αποΑ-I, *in vivo*.

### **Συμπεράσματα**

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF4a και Smad3 φαίνεται να συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων των αποCIII και αποΑ-I, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα για την Smad3, το γεγονός ότι υπερέκφρασή της προκαλεί σημαντική παθολογική εικόνα και θάνατο στους ποντικούς που χρησιμοποιήθηκαν, υποδεικνύει ότι παίζει σημαντικό ρόλο και αξίζει να μελετηθεί η δράση της στο σύνολο του γονιδιώματος του ποντικού, που όμως δεν ήταν στους σκοπούς της παρούσας διατριβής. Είναι φανερό ότι χρειάζονται περισσότερα πειράματα για να επιβεβαιωθούν και να μελετηθούν περαιτέρω οι σχέσεις αυτών αλλά και άλλων μεταγραφικών παραγόντων με την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών Α-I και CIII, *in vivo*. Απώτερος σκοπός είναι να βρεθούν μηχανισμοί που να οδηγήσουν σε αύξηση της έκφρασης της αποΑ-I και μείωση της έκφρασης της αποCIII.



**Εικόνα 46.** Αυτοραδιογραφία ανάλυσης κατά Northern ολικού RNA C57BL/6 ποντικών, 3 ημέρες μετά την μόλυνσή τους με αδενοϊούς ( $3 \times 10^8$  pfu) που εκφράζουν την πρωτεΐνη ελέγχου GFP ή την πρωτεΐνη Smad3 ή με συνδυασμό αδενοϊών που εκφράζουν την πρωτεΐνη Smad3 και τον υποδοχέα ALK5. Στην εικόνα φαίνεται το σήμα από τους ανιχνευτές για την αποA-I του ποντικού (mapoA-I) και την mGAPDH.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## **A. *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΔΟΜΗΣ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-I**

### **Η προσέγγιση της μελέτης των μεταλλάξεων της αποΑ-I**

Η βιογένεση της HDL, θεωρείται ένα συνεχές μονοπάτι κατά το οποίο, η αποΑ-I και διάφορες πρωτεΐνες, αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένο τρόπο για να σχηματίσουν αρχικά την preβ-HDL, και στη συνέχεια, με περαιτέρω λιπιδίωση, τα δισκοειδή και σφαιρικά σωματίδια HDL, τα οποία θεωρούνται ως τα βιολογικά ενεργά σωματίδια (Zannis et al. 2006). Η σειρά και οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών στα αρχικά βήματα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL, δεν είναι απολύτως γνωστά και αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής.

Η στρατηγική που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη είναι η μεταφορά γονιδίων μέσω ανασυνδυασμένων αδενοϊών, σε επίμυες με έλλειψη της ενδογενούς αποΑ-I (αποΑ-I<sup>-/-</sup>). Ο σχεδιασμός έγινε έτσι ώστε να αναγνωριστούν συγκεκριμένα βήματα στο μονοπάτι της HDL στα οποία ενδιάμεσες μορφές σωματιδίων της αποΑ-I δεν ωριμάζουν προς το τελικό προϊόν (σφαιρική HDL) αλλά συσσωρεύονται στο πλάσμα ή καταβολίζονται. Η στρατηγική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία, για παρόμοιες μελέτες, από το εργαστήριο του Δρ. Βασίλη Ζαννή και έχουν αναγνωριστεί διακριτοί φαινότυποι που χαρακτηρίζονται από ελαττωματική σύνθεση της HDL, λόγω προβληματικής αλληλεπίδρασης του ABCA1 με την αποΑ-I ή συσσώρευση δισκοειδών σωματιδίων λόγω ελαττωματικής ενεργοποίησης της LCAT (Chroni et al. 2003; Chroni et al. 2005a) καθώς και από διάφορες μορφές δυσλιπιδαιμίας (Chroni et al. 2004a; Chroni et al. 2005a; Chroni et al. 2005b; Reardon et al. 2001; Zannis et al. 2004a).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των φυσικά απαντώμενων μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I, αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και αποΑ-I(Leu178Pro) καθώς και μιας νέας τεχνητής μετάλλαξης, που εκφράζει την πρωτεΐνη αποΑ-I(Arg149Ala), στην βιογένεση της HDL.

Οι φαινότυποι των αποΑ-I<sup>-/-</sup> επίμυων οι οποίοι μολύνθηκαν με αδενοϊούς που φέρουν τις παραπάνω μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I αναμένεται να προσομοιάζουν τους φαινότυπους που έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς ημιζυγώτες ή ετεροζυγώτες για τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, όπως αυτές περιγράφονται στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής. Για τις περισσότερες από αυτές τις μεταλλαγμένες μορφές έχουν περιγραφεί ετεροζυγώτες ασθενείς, άτομα δηλαδή που εκφράζουν κανονικά την WT αποΑ-I από το ένα αλληλόμορφο και την μεταλλαγμένη μορφή της αποΑ-I στο άλλο, γεγονός που εμπόδιζε την μελέτη των ιδιοτήτων μόνο των μεταλλαγμένων μορφών αποΑ-I. Τα μοντέλα επίμυων που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή επέτρεψαν την μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών χωρίς την παρουσία της αγρίου τύπου αποΑ-I.

Ο σχηματισμός HDL εκτιμήθηκε μέσω ανάλυσης του πλάσματος με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε FPLC, με ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις (2D) και μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Άλλες παράμετροι που εκτιμήθηκαν και που μπορούν να υποδείξουν πιθανές ανωμαλίες στην βιογένεση της HDL είναι η κατανομή της αποΑ-I στα διάφορα κλάσματα του πλάσματος και ο υπολογισμός του λόγου εστέρων χοληστερόλης προς ολική χοληστερόλη (CE/TC) της HDL του πλάσματος.

Παράλληλα, εξετάστηκαν *in vitro* οι λειτουργικές ιδιότητες των μεταλλαγμένων μορφών, σε σχέση με την WT αποΑ-I. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα των

μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I να επάγουν έξοδο της χοληστερόλης μέσω του ABCA1 από μακροφάγα επιτρέποντας την αναγνώριση πιθανών ανωμαλιών στην λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ της αποΑ-I και του ABCA1 η οποία οδηγεί στην αρχική λιπιδίωση της αποΑ-I (Fitzgerald et al. 2004a). Μια άλλη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η ικανότητα της κάθε μεταλλαγμένης μορφής να επάγει εστεροποίηση της χοληστερόλης σε rHDL σωματίδια, δηλαδή η ικανότητα ενεργοποίησης της δράσης του ενζύμου LCAT. Η παράμετρος αυτή μπορεί να αναγνωρίσει ανωμαλίες που εμποδίζουν την ωρίμανση των λιπιδιωμένων μορίων αποΑ-I και το σχηματισμό σφαιρικών HDL σωματιδίων μεγάλου μεγέθους.

### **Η βαρύτητα του φαινοτύπου διαφέρει μεταξύ των μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-I**

Σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες, που έγιναν για μερικές από τις μεταλλαγμένες μορφές (Daum et al. 1999a; Daum et al. 1999b; Cho et al. 2001; Sviridov et al. 2000), οι *in vitro* δοκιμές της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι οι μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I που παρουσίασαν παθολογικό φαινότυπο στις *in vivo* μελέτες, εμφάνισαν σχεδόν φυσιολογική ικανότητα εξόδου χοληστερόλης από τα κύτταρα μέσω του ABCA1 αλλά σημαντικά μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT (**Εικόνα 31**).

Με βάση τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών και λαμβάνοντας υπ' όψιν τις επιπτώσεις της κάθε μεταλλαγμένης αποΑ-I μορφής στο φαινότυπο των επίμυων, οι μεταλλάξεις που μελετήθηκαν μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται οι μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> που προκαλούν βαρύτερο παθολογικό φαινότυπο σε επίμυες που

εκφράζονται. Ενώ στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, αποΑ-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και αποΑ-I(Arg149Ala) η έκφραση των οποίων προκαλεί μικρότερες αλλαγές στο φαινότυπο των επίμυων που τις εκφράζουν.

Η μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-I(Leu178Pro) δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την λειτουργικότητα της αποΑ-I στο σύστημα μελέτης που χρησιμοποιήθηκε. Προφανώς, η μετάλλαξη αυτή δεν επηρεάζει την βιογένεση της HDL στα αρχικά στάδια σχηματισμού της αλλά ίσως σε μεταγενέστερα στάδια να επηρεάζει την σταθερότητα ή τις ιδιότητες της HDL που σχηματίζει οδηγώντας έτσι στον παθολογικό φαινότυπο που προκαλεί σε ανθρώπους-φορείς της (Hovingh et al. 2004), χρειάζεται όμως άλλη πειραματική προσέγγιση και λεπτομερής ανάλυση της HDL για την περαιτέρω μελέτης της μεταλλαγμένης αυτής μορφής της αποΑ-I.

#### **Οι μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>**

Όταν εκφράστηκαν σε αποΑ-I<sup>-/-</sup> επίμυες, οι μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποΑ-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> οδήγησαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης και αποΑ-I στο πλάσμα και σχηματισμό preβ-HDL και μόνο, μικρού μεγέθους, α4-HDL σωματιδίων. Επίσης, στους επίμυες αυτούς σχηματίστηκε πολύ μικρός αριθμός σφαιρικών HDL σωματιδίων παρόμοιος με αυτόν που σχηματίζεται στο πλάσμα επίμυων που εκφράζουν μόνο την πρωτεΐνη ελέγχου, GFP, ενώ και ο λόγος CE/TC του πλάσματος και της HDL ήταν κατά πολύ μειωμένος.

Προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι ημιζυγώτες (σύνθετοι ετεροζυγώτες (compound heterozygotes) για ένα ελλειματικό αλληλόμορφο (null) και ένα αλληλόμορφο με την μετάλλαξη) για την μεταλλαγμένη μορφή αποΑ-



I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> εμφάνιζαν σημαντική μείωση στα επίπεδα apoA-I στο πλάσμα και σχεδόν απουσία HDL-χοληστερόλης. Ασθενείς ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη αυτή εμφάνιζαν επίπεδα HDL-χοληστερόλης και apoA-I πρωτεΐνης μειωμένα στο 50% του φυσιολογικού, (Miccoli et al. 1996; Pisciotta et al. 2003). Το πλάσμα των ημιζυγωτών περιείχε preβ1-HDL και χαμηλή συγκέντρωση μικρών σωματιδίων με α-ηλεκτροφορητική κινητικότητα (Miccoli et al. 1997).

Ο Miccoli και οι συνεργάτες του, εξέτασαν, επίσης, την ικανότητα πλάσματος από σύνθετους ετεροζυγώτες να επάγει την έξοδο χοληστερόλης από ινοβλάστες, την οποία υπολόγισαν στο 58% αυτής που επάγει πλάσμα από φυσιολογικά άτομα, και έτσι υποστήριξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> επηρεάζει την έξοδο χοληστερόλης (Miccoli et al. 1997). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι στα παραπάνω πειράματα εξόδου χοληστερόλης με χρήση ινοβλαστών μετρήθηκε η έξοδος χοληστερόλης που επάγεται τόσο από τον ABCA1 όσο και από τον ABCG1 και SR-BI. Στην παρούσα διατριβή μετρήθηκε μόνο η ABCA1-εξαρτώμενη έξοδος χοληστερόλης από μακροφάγα και φάνηκε ότι η έξοδος χοληστερόλης που επάγει η μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> είναι σε φυσιολογικά επίπεδα (**Εικόνα 29**).

Μελέτες σε ασθενείς ετεροζυγώτες ως προς την μετάλλαξη για την apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> καθώς και σε επίμυες που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή μέσω αδενοϊών έδειξαν ότι προκαλεί μεγάλη μείωση στα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης και της apoA-I στο πλάσμα (Miettinen et al. 1997a), και ότι κατανέμονται κυρίως στην περιοχή της HDL3 (Miettinen et al. 1997b). Αναφέρεται επίσης, ότι σχηματίζουν μικρού μεγέθους HDL σωματίδια (8-9 nm) και έχουν μειωμένα επίπεδα εστέρων χοληστερόλης στο πλάσμα και την HDL (Miettinen et al. 1997b; McManus et al. 2001). Ανάλυση του

πλάσματος από επίμυες μολυσμένους με αδενοϊούς που εκφράζουν την αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, σε μια διάσταση, έδειξε ότι σχηματίζονται κυρίως σωματίδια με preβ-ηλεκτροφορητική κινητικότητα καθώς και σωματίδια με ενδιάμεση κινητικότητα μεταξύ α- και preβ (McManus et al. 2001). Τα σωματίδια αυτά, από την κινητικότητά τους, φαίνεται να αντιστοιχούν στα α4-HDL σωματίδια που παρατηρήθηκαν στην παρούσα διατριβή, μετά από ανάλυση του πλάσματος με ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις.

### **Οι μεταλλαγμένες μορφές αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub>, αποA-I(Arg149Ala) και αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>**

Γονιδιακή μεταφορά για τις αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και αποA-I(Arg149Ala) σε αποA-I<sup>-/-</sup> επίμυες οδήγησε σε σημαντική μείωση της αποA-I και της HDL-χοληστερόλης στο πλάσμα, σε σχέση με την WT αποA-I. Επίσης, οδήγησε στο σχηματισμό preβ-HDL και υψηλής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας α4-HDL σωματιδίων, συσσώρευση δισκοειδών HDL σωματιδίων στο πλάσμα, μείωση της αναλογίας CE/TC στο πλάσμα και στην HDL καθώς και μετατόπιση της κατανομής της αποA-I και της χοληστερόλης προς την περιοχή της HDL3. Συνολικά, ο φαινότυπος των επίμυων που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I(Arg149Ala) ή αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> ήταν ίδιος. Παρόμοια εικόνα φαίνεται να προκαλεί και η μετάλλαξη κατά την οποία αντικαθίστανται μαζί και τα δύο αμινοξέα Arg160/His162 από Ala και Val, αντίστοιχα (Chroni et al. 2005a).

Οι παρατηρήσεις της παρούσας διατριβής είναι συμβατές με προηγούμενες μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> εμφάνιζαν επίπεδα HDL και αποA-I περίπου στο 60% και 70% του φυσιολογικού,

αντίστοιχα, σχημάτιζαν  $\text{pre}\beta$ 1- και μικρού μεγέθους  $\alpha$ -HDL σωματίδια και χαρακτηρίζονταν από 30% μειωμένη δραστικότητα LCAT στο πλάσμα τους (Leren et al. 1997).

Η μεταλλαγμένη μορφή  $\text{apoA-I}(\text{Arg149Ala})$  είναι μια νέα τεχνητή μετάλλαξη και δεν έχει μελετηθεί σε πειράματα γονιδιακής μεταφοράς σε μοντέλα ζώων.

Ετεροζυγώτες για την  $\text{apoA-I}(\text{Arg151Cys})_{\text{Paris}}$  είχαν περίπου 50% του φυσιολογικού HDL-χοληστερόλη και  $\text{apoA-I}$ , μειωμένη δραστικότητα LCAT στο πλάσμα τους, και μετατόπιση της  $\text{apoA-I}$  και της χοληστερόλης προς την περιοχή της HDL3 (Bruckert et al. 1997). Φορείς της μετάλλαξης για την  $\text{apoA-I}(\text{Arg151Cys})_{\text{Paris}}$  δεν είχαν σημάδια στεφανιαίας νόσου (Bruckert et al. 1997). Αναφέρεται ότι αυτό μπορεί να οφείλεται σε καλύτερες αντι-οξειδωτικές ιδιότητες της μορφής αυτής της  $\text{apoA-I}$  λόγω της ελεύθερης κυστεΐνης που φέρει στην επιφάνεια της  $\alpha$ -έλικας (Bielicki and Oda 2002).

Τα παραπάνω ευρήματα της *in vivo* μελέτης που χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης και τον σχηματισμό κυρίως  $\text{pre}\beta$ - και  $\alpha$ 4-HDL σωματιδίων, συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς-φορείς των μεταλλάξεων (Miccoli et al. 1997; Miccoli et al. 1996; Pisciotta et al. 2003; Miettinen et al. 1997b; McManus et al. 2001). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η προσέγγιση της μεταφοράς γονιδίων μέσω αδενοϊών στους  $\text{apoA-I}^{-/-}$  επίμυες είναι αποτελεσματική και προσομοιάζει τον παθολογικό φαινότυπο που προκαλείται από συγκεκριμένες μεταλλάξεις της  $\text{apoA-I}$  στους ανθρώπους.

*Η χορήγηση LCAT σε επίμυες μπορεί να διορθώσει την παθολογική εικόνα της HDL που προκαλείται από τις μεταλλαγμένες μορφές apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και apoA-I(Arg149Ala).*

Επιπρόσθετη πληροφορία για την μοριακή αιτιολογία των χαμηλών επιπέδων HDL στους ασθενείς που φέρουν τις μεταλλάξεις για τις apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> καθώς και του φαινότυπου των επίμυων που εκφράζουν την apoA-I(Arg149Ala), ελήφθη με πειράματα μόλυνσης apoA-I<sup>-/-</sup> επίμυων με συνδυασμό αδενοϊών που εκφράζουν κάθε μια μεταλλαγμένη μορφή μαζί με αδενοϊούς που εκφράζουν την LCAT του ανθρώπου (hLCAT). Ο συνδυασμός αυτός (εν συντομία θα αναφέρεται ως “apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT”) διόρθωσε τα επίπεδα της apoA-I και της HDL στο πλάσμα των επίμυων, επανέφερε το λόγο CE/TC σε φυσιολογικά επίπεδα και οδήγησε στο σχηματισμό σφαιρικών σωματιδίων HDL με φυσιολογικούς preβ- και α-HDL υποπληθυσμούς.

Η επαναφορά των επιπέδων της apoA-I και της HDL σε κανονικά επίπεδα (όπως αυτά ορίζονται από την WT apoA-I) μετά από την συνδυασμένη έκφραση της hLCAT, υποδεικνύει ότι οι μεταλλαγμένες μορφές apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και apoA-I(Arg149Ala) εκφράζονται και εκκρίνονται αποτελεσματικά από το ήπαρ και ότι τα χαμηλά επίπεδα apoA-I πρωτεΐνης που παρατηρήθηκαν στο πλάσμα επίμυων όταν εκφράζουν καθεμία από τις πρωτεΐνες αυτές μόνες τους, δεν οφείλονται σε προβλήματα έκφρασης ή έκκρισης των πρωτεϊνών. Φαίνεται δηλαδή ότι το βήμα που επηρεάζεται

είναι αυτό της εστεροποίησης της χοληστερόλης από το ένζυμο LCAT, στα σωματίδια που σχηματίζει η αποΑ-I.

Τα *in vivo* ευρήματα υποστηρίζονται και από τις μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων αλλά και από τις *in vitro* λειτουργικές δοκιμές για τις διάφορες μορφές της αποΑ-I από αυτή καθώς και προηγούμενες μελέτες. Έτσι, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-I εκκρίνονται αποτελεσματικά από καλλιέργειες κυττάρων, έχουν φυσιολογική ικανότητα να επάγουν ABCA1-εξαρτώμενη έξοδο χοληστερόλης από J774 μακροφάγα (ενεργοποιημένα με το ανάλογο του cAMP) αλλά παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης της LCAT, *in vitro* (McManus et al. 2001; Miettinen et al. 1997b).

#### **Τα αμινοξέα Arg149, Arg 151 και Arg160 της αποΑ-I στα δισκοειδή HDL σωματίδια, συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με την LCAT**

Η μειωμένη ικανότητα μορφών της αποΑ-I που φέρουν αντικαταστάσεις αμινοξέων στην περιοχή μεταξύ των 149 και 160 αμινοξέων, να ενεργοποιήσουν την LCAT έχει φανεί από *in vitro* πειράματα της παρούσας αλλά και παλαιότερων μελετών (Leren et al. 1997; Daum et al. 1999a; Daum et al. 1999b; Roosbeek et al. 2001; Cho et al. 2001; Gorshkova et al. 2006). Υποστηρίζεται ότι η Arg160 παίζει άμεσο ρόλο στην ενεργοποίηση της LCAT (Cho et al. 2001). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο αμινοξύ αυτό δεν φαίνεται να επηρεάζουν την δομή και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της αποΑ-I αλλά έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ικανότητα ενεργοποίησης της LCAT (Roosbeek et al. 2001; Cho et al. 2001). Παρομοίως, η αντικατάσταση της Arg149 από γλουταμικό οξύ (Glu) δεν είχε καμία επίπτωση στην δομή και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της αποΑ-I αλλά

ελαχιστοποίησε την ικανότητα της πρωτεΐνης να ενεργοποιεί την LCAT (Roosbeek et al. 2001).

Τα αμινοξέα Arg149, Arg153 και Arg160, τα οποία εντοπίζονται στο όριο υδρόφοβης/υδρόφιλης επιφάνειας της αμφιπαθικής έλικας 6 της αποΑ-I (**Εικόνα 20**), δημιουργούν το μόνο σημαντικό θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό της πρωτεΐνης (Roosbeek et al. 2001). Στο μοντέλο διπλής ζώνης (double belt), που περιγράφεται στην Εισαγωγή, τα αμινοξέα αυτά δεν σχηματίζουν διαμοριακές (interhelical) γέφυρες άλατος με την αντίστοιχη αντιπαράλληλη αλληλουχία μεταξύ των αμινοξέων 99 - 120 αλλά μπορούν ή να σχηματίζουν ενδομοριακές (intrahelical) αλληλεπιδράσεις ή να μένουν ελεύθερες για ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα της LCAT και έτσι να επάγουν την ενεργοποίησή της (Roosbeek et al. 2001).

Όταν η Arg149 ή η Arg160 αντικαθίστανται από αλανίνη (Ala) ή άλλα υδρόφοβα αμινοξέα, η συνολική υδροφοβικότητα του μορίου αυξάνει και το θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό της περιοχής μειώνεται. Η μείωση αυτή μπορεί να εξηγεί την μειωμένη ικανότητα αυτών των μεταλλαγμένων μορφών να ενεργοποιήσουν την LCAT *in vitro* και *in vivo*.

Η μειωμένη ικανότητα της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub> να ενεργοποιήσει αποτελεσματικά την LCAT *in vitro* και *in vivo* μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική οργάνωση των δύο αντιπαράλληλων μορίων σε σχέση με την οργάνωση της WT αποΑ-I λόγω του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων Cys151 που φέρει η πρωτεΐνη αυτή (Klon et al. 2000).

**Τα αμινοξέα Leu141 και Leu159 της apoA-I συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με την LCAT σε πολύ πρώιμο στάδιο της βιογένεσης της HDL**

Λόγω της ανεπάρκειας ενεργοποίησης της LCAT φαίνεται ότι η νεοσυντιθέμενη φτωχή-λιπιδίων apoA-I που σχηματίζεται από τις αλληλεπιδράσεις της με τον ABCA1, απομακρύνεται από το πλάσμα. Αυτό υποστηρίζεται και από παλαιότερες μελέτες όπου έχει παρατηρηθεί αυξημένος καταβολισμός (fractional catabolic rate) της HDL που σχηματίζεται από την apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> (Miettinen et al. 1997b) καθώς και συσσώρευση προ-apoA-I στο πλάσμα ημιζυγωτών για την μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(L141R)<sub>Pisa</sub> (Miccoli et al. 1996). Συσσώρευση προ-apoA-I έχει παρατηρηθεί και σε ανθρώπους με την ασθένεια Tangier (Zannis et al. 1982) η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένο καταβολισμό της HDL (Assmann et al. 2001). Όπως είναι γνωστό, η cubulin, μια μεμβρανική πρωτεΐνη 600 kDa, μπορεί και προσδένει apoA-I και HDL και επάγει τον καταβολισμό τους από τους νεφρούς (Kozyraki et al. 1999; Hammad et al. 1999).

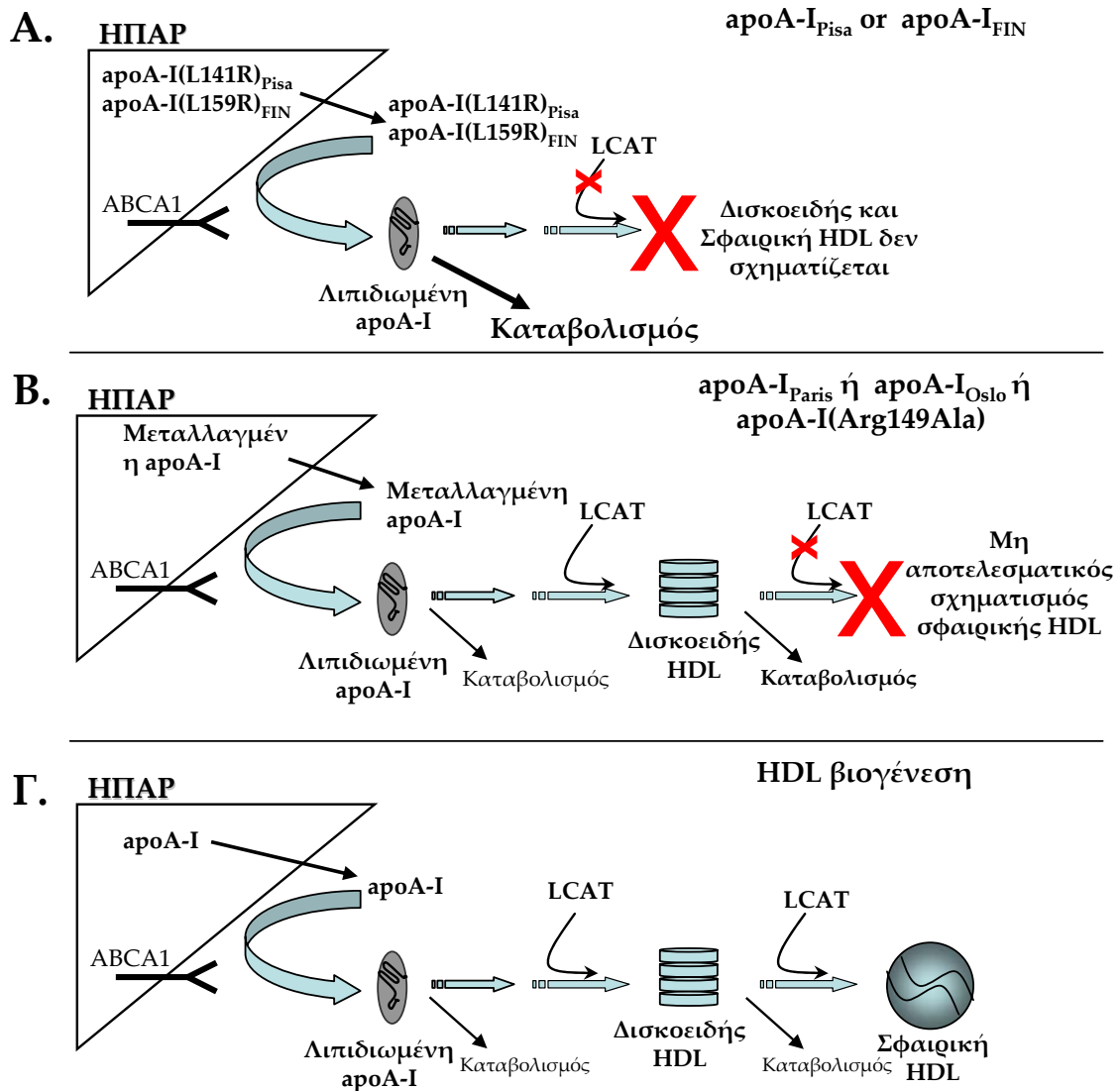
Ανάλυση της σχετικής συγκέντρωσης της ενδογενούς LCAT σε apoA-I<sup>-/-</sup> επίμυες που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> έδειξε ότι υπήρχε δραματική μείωση της LCAT σε σχέση με επίμυες που εκφράζουν την WT apoA-I. Η LCAT του πλάσματος σε επίμυες που εκφράζουν το συνδυασμό “apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> + hLCAT”, αποκαταστάθηκε σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν σε επίμυες που εκφράζουν την WT apoA-I (**Εικόνα 38Δ**). Η δραματική μείωση της ενδογενούς LCAT πλάσματος στους επίμυες εκφράζουν μεταλλαγμένες μορφές της apoA-I μπορεί να είναι το αποτέλεσμα του αυξημένου ρυθμού αποικοδόμησης της φτωχής-λιπιδίων μεταλλαγμένης apoA-I που βρίσκεται συνδεδεμένη με την ενδογενή LCAT.

**Οι δύο ομάδες μεταλλάξεων αποκαλύπτουν δύο διαφορετικά βήματα στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL.**

Παρουσία περίσσειας LCAT, μέσω της χορήγησης αδενοϊών που εκφράζουν την hLCAT, η εστεροποίηση της χοληστερόλης τόσο των νεοσυντιθέμενων preβ-σωματιδίων [στην περίπτωση των apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>], όσο και των δισκοειδών σωματιδίων της HDL [στην περίπτωση των apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και apoA-I(Arg149Ala)], φαίνεται να αναστέλλει τον γρήγορο καταβολισμό τους και να επιτρέπει την ωρίμανση τους σε δισκοειδή ή/και στη συνέχεια σφαιρικά σωματίδια HDL, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των μεταλλαγμένων μορφών apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και apoA-I(Arg149Ala) της παρούσας διατριβής, καθώς και της μεταλλαγμένης μορφής apoA-I(Arg160Ala/His162Val) που έχει μελετηθεί παλαιότερα (Chroni et al. 2005a), φαίνεται να υπάρχει ανεπαρκής εστεροποίηση της χοληστερόλης γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση δισκοειδών σωματιδίων στο πλάσμα. Στην περίπτωση αυτή, δηλαδή, φαίνεται να εμποδίζεται το βήμα μετατροπής της δισκοειδούς HDL σε σφαιρική (**Εικόνα 47B**). Στην περίπτωση, όμως, των apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> φαίνεται, για πρώτη φορά, ότι αναστέλλεται ένα νωρίτερο βήμα στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL που προηγείται του σχηματισμού δισκοειδών σωματιδίων (**Εικόνα 47A**).





**Εικόνα 47Α-Γ.** Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού βιογένεσης της HDL και πώς οι μεταλλαγμένες μορφές επηρεάζουν την εστεροποίηση της χοληστερόλης **A.** των preβ-HDL σωματιδίων, στην περίπτωση των apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, **B.** των δισκοειδών σωματιδίων, στην περίπτωση των apoA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, apoA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και apoA-I(Arg149Ala), και **Γ.** το μονοπάτι βιογένεσης/ωρίμανσης της HDL, παρουσία της WT apoA-I.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες (Miccoli et al. 1996; Pisciotta et al. 2003; Miettinen et al. 1997b; Miettinen et al. 1997a; McManus et al. 2001), δείχνουν ότι, στην περίπτωση των αποA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> και αποA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, μετά την αρχική λιπιδίωση της αποA-I, η LCAT δεν εστεροποιεί αποτελεσματικά την χοληστερόλη των preβ σωματιδίων. Αυτό οδηγεί στην γρήγορη απομάκρυνσή της preβ-HDL, και μαζί και της LCAT, και τον καταβολισμό τους, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της HDL, της αποA-I και της LCAT στο πλάσμα.

Στην περίπτωση των αποA-I(Arg151Cys)<sub>Paris</sub>, αποA-I(Arg160Leu)<sub>Oslo</sub> και αποA-I(Arg149Ala), μετά την αρχική λιπιδίωσή της η αποA-I προχωρά και σχηματίζει δισκοειδή σωματίδια. Η εστεροποίηση της χοληστερόλης από την LCAT, όμως, είναι ανεπαρκής και τα δισκοειδή σωματίδια δεν μετατρέπονται με ικανοποιητικό ρυθμό σε σφαιρικά σωματίδια. Η καθυστέρηση αυτή οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα HDL λόγω αποικοδόμησης των δισκοειδών σωματιδίων (Kozyraki et al. 1999; Hammad et al. 1999)

Η διόρθωση των διαφόρων παθολογικών φαινοτύπων, σε όλα τα επίπεδα, από την χορήγηση της LCAT μπορεί να αποτελέσει την βάση για πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την διόρθωση χαμηλών επιπέδων της HDL που προκαλείται από συγκεκριμένες μεταλλάξεις της αποA-I.

## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Η μελέτη φυσικά απαντώμενων μεταλλάξεων συμβάλλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που επηρεάζουν διάφορα βήματα του μονοπατιού βιογένεσης της HDL. Επίσης, προσφέρει τρόπους διάγνωσης, πρόγνωσης και θεραπείας.

Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής αποτελούν τη βάση για πιθανές περαιτέρω μελέτες πάνω στη σχέση δομής-λειτουργίας της απολιποπρωτεΐνης A-I. Παρόμοιες μελέτες με τις οποίες θα εξεταστούν μεταλλαγές συγκεκριμένων αμινοξέων τόσο την περιοχή ενεργοποίησης της LCAT όσο και σε άλλες περιοχές της αποA-I μπορεί να αναγνωρίσουν κρίσιμα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες του μεταβολισμού της HDL και επηρεάζουν την βιογένεση και την ομοιόσταση των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα.

Τέτοιες μεταλλαγές μπορεί να επηρεάσουν την δομή της ώριμης HDL ή τον σχηματισμό των preβ σωματιδίων. Νέοι φαινότυποι μπορεί να αναγνωριστούν στο μέλλον οι οποίοι να προκαλούνται από ελλατωματικές αλληλεπιδράσεις της αποA-I με άλλες σημαντικές πρωτεΐνες όπως ο SR-BI, η ηπατική λιπάση, η CETP, η PLTP και η αποM. Σημαντική γνώση για την επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I πάνω στην βιογένεση της HDL μπορεί να αποκτηθεί στο μέλλον από λεπτομερή ανάλυση της σύνθεσης των διαφόρων σωματιδίων και υποπληθυσμών της HDL κατά την βιογένεσή της σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Ήδη υπάρχουν αναφορές για πρωτεομική ανάλυση (proteomics) της HDL (Heller et al. 2005; Heller et al. 2007; Rezaee et al. 2006; Vaisar et al. 2007), η ανάπτυξη της οποίας μπορεί στο μέλλον να

αποκαλύψει νέες σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην βιογένεση και λειτουργία της HDL.

Είναι επίσης σημαντική η δυνατότητα που δίνεται μέσα από τέτοιες μελέτες να αναγνωριστούν και να αναπτυχθούν νέες διαγνωστικές μέθοδοι για ανωμαλίες στην βιογένεση της HDL. Τέτοια χρήση μπορεί να έχουν η μελέτη κατανομής της apoA-I σε πυκνότητες που διαφέρουν από την φυσιολογική κατανομή, όπως, για παράδειγμα, η μετατόπιση της στην περιοχή της HDL<sub>3</sub>. Άλλες παράμετροι που μπορεί να έχουν διαγνωστική αξία είναι η μείωση του λόγου εστέρων χοληστερόλης προς ολική χοληστερόλη (CE/TC) ή τέλος οι αλλαγές του λόγου των pρεβ προς τα α-HDL σωματίδια που κυκλοφορούν στο πλάσμα.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Aiello, R. J., Brees, D., Bourassa, P. A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpassand, M. and Francone, O. L. 2002. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 630-637.
2. Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M. and 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.
3. Anderson, K. M., Wilson, P. W., Odell, P. M. and Kannel, W. B. 1991. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. - *Circulation* 83: 356-362.
4. Arakawa, R., Hayashi, M., Remaley, A. T., Brewer, B. H., Yamauchi, Y. and Yokoyama, S. 2004. Phosphorylation and stabilization of ATP binding cassette transporter A1 by synthetic amphiphilic helical peptides. - *J. Biol. Chem.* 279: 6217-6220.
5. Assmann, G., von Eckardstein, A. and Brewer, H. B. 2001. Familial analphalipoproteinemia: Tangier disease. - In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D. (eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* . McGraw-Hill, pp. 2937-2960.
6. Asztalos, B. F., Collins, D., Cupples, L. A., Demissie, S., Horvath, K. V., Bloomfield, H. E., Robins, S. J. and Schaefer, E. J. 2005. Value of high-density

- lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 2185-2191.
7. Asztalos, B. F., Cupples, L. A., Demissie, S., Horvath, K. V., Cox, C. E., Batista, M. C. and Schaefer, E. J. 2004. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 2181-2187.
  8. Asztalos, B. F., Roheim, P. S., Milani, R. L., Lefevre, M., McNamara, J. R., Horvath, K. V. and Schaefer, E. J. 2000. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2670-2676.
  9. Attie, A. D., Kastelein, J. P. and Hayden, M. R. 2001. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. - *J. Lipid Res.* 42: 1717-1726.
  10. Barter, P. J., Brewer, H. B., Jr., Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J. and Tall, A. R. 2003. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 160-167.
  11. Basso, F., Freeman, L., Knapper, C. L., Remaley, A., Stonik, J., Neufeld, E. B., Tansey, T., Amar, M. J., Fruchart-Najib, J., Duverger, N., Santamarina-Fojo, S. and Brewer, H. B., Jr. 2003. Role of the hepatic ABCA1 transporter in

- modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. -  
J. Lipid Res. 44: 296-302.
12. Berliner, J. A. and Watson, A. D. 2005. A Role for Oxidized Phospholipids in Atherosclerosis. - N Engl J Med 353: 9-11.
  13. Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L. P., Samson-Bouma, M. E. and Wetterau, J. R. 2000. THE ROLE OF THE MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN IN ABETALIPOPROTEINEMIA. - Annual Review of Nutrition 20: 663-697.
  14. Berthou, L., Duverger, N., Emmanuel, F., Langouet, S., Auwerx, J., Guillouzo, A., Fruchart, J. C., Rubin, E., Deneffe, P., Staels, B. and Branellec, D. 1996. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. - J. Clin. Invest 97: 2408-2416.
  15. Bielicki, J. K. and Forte, T. M. 1999. Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity. - J. Lipid Res. 40: 948-954.
  16. Bielicki, J. K. and Oda, M. N. 2002. Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. - Biochemistry 41: 2089-2096.
  17. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J. and Schmitz,



- G. 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. - *Nat. Genet.* 22: 347-351.
18. Borhani, D. W., Engler, J. A. and Brouillette, C. G. 1999. Crystallization of truncated human apolipoprotein A-I in a novel conformation. - *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55 ( Pt 9): 1578-1583.
19. Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A. and Brouillette, C. G. 1997. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 12291-12296.
20. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouellette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J. and Hayden, M. R. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. - *Nat. Genet.* 22: 336-345.
21. Brousseau, M. E., Schaefer, E. J., Wolfe, M. L., Bloedon, L. T., Digenio, A. G., Clark, R. W., Mancuso, J. P. and Rader, D. J. 2004. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. - *N. Engl. J. Med.* 350: 1505-1515.
22. Bruckert, E., von Eckardstein, A., Funke, H., Beucler, I., Wiebusch, H., Turpin, G. and Assmann, G. 1997. The replacement of arginine by cysteine at residue 151

- in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-IMilano. - *Atherosclerosis* 128: 121-128.
23. Brunham, L. R., Kruit, J. K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J. M., Pape, T. D., Coburn, B. A., Bissada, N., Staels, B., Groen, A. K., Hussain, M. M., Parks, J. S., Kuipers, F. and Hayden, M. R. 2006. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. - *J. Clin. Invest.* 116: 1052-1062.
  24. Brunzell, J. D. and Deeb, S. S. 2001. Familial lipoprotein lipase deficiency, apoC-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. - In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D. and Sly, W. S. (eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, pp. 2789-2816.
  25. Buechler, C., Boettcher, A., Bared, S. M., Probst, M. C. and Schmitz, G. 2002. The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-syntrophin/utrophin complex. - *Biochem Biophys Res. Commun.* 293: 759-765.
  26. Carlson, L. A. and Philipson, B. 1979. Fish-eye disease. A new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia. - *Lancet* 2: 922-924.
  27. Chambenoit, O., Hamon, Y., Marguet, D., Rigneault, H., Rosseneu, M. and Chimini, G. 2001. Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. - *J. Biol. Chem.* 276: 9955-9960.
  28. Cheung, P. and Chan, L. 1983. Nucleotide sequence of cloned cDNA of human apolipoprotein A-I. - *Nucleic Acids Res.* 11: 3703-3715.

29. Cheung, P., Kao, F. T., Law, M. L., Jones, C., Puck, T. T. and Chan, L. 1984. Localization of the structural gene for human apolipoprotein A-I on the long arm of human chromosome 11. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81: 508-511.
30. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V. and Staels, B. 2001. PPAR-[alpha] and PPAR-[gamma] activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. - *Nat Med* 7: 53-58.
31. Cho, K. H., Durbin, D. M. and Jonas, A. 2001. Role of individual amino acids of apolipoprotein A-I in the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase and in HDL rearrangements. - *J. Lipid Res.* 42: 379-389.
32. Chou, W. C., Prokova, V., Shiraishi, K., Valcourt, U., Moustakas, A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Zannis, V. I. and Kardassis, D. 2003. Mechanism of a Transcriptional Cross Talk between Transforming Growth Factor-beta-regulated Smad3 and Smad4 Proteins and Orphan Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor-4. - *Mol. Biol. Cell* 14: 1279-1294.
33. Christiansen-Weber, T. A., Volland, J. R., Wu, Y., Ngo, K., Roland, B. L., Nguyen, S., Peterson, P. A. and Fung-Leung, W. P. 2000. Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. - *Am. J. Pathol.* 157: 1017-1029.

34. Chroni, A., Duka, A., Kan, H. Y., Liu, T. and Zannis, V. I. 2005a. Point mutations in apolipoprotein a-I mimic the phenotype observed in patients with classical lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. - *Biochemistry* 44: 14353-14366.
35. Chroni, A., Kan, H. Y., Kypreos, K. E., Gorshkova, I. N., Shkodrani, A. and Zannis, V. I. 2004a. Substitutions of glutamate 110 and 111 in the middle helix 4 of human apolipoprotein A-I (apoA-I) by alanine affect the structure and in vitro functions of apoA-I and induce severe hypertriglyceridemia in apoA-I-deficient mice. - *Biochemistry* 43: 10442-10457.
36. Chroni, A., Kan, H. Y., Shkodrani, A., Liu, T. and Zannis, V. I. 2005b. Deletions of Helices 2 and 3 of Human ApoA-I Are Associated with Severe Dyslipidemia following Adenovirus-Mediated Gene Transfer in ApoA-I-Deficient Mice. - *Biochemistry* 44: 4108-4117.
37. Chroni, A., Koukos, G., Duka, A. and Zannis, V. I. 2007. The Carboxy-Terminal Region of apoA-I Is Required for the ABCA1-Dependent Formation of  $\beta$ -HDL But Not Pre $\beta$ -HDL Particles in Vivo. - *Biochemistry* 46: 5697-5708.
38. Chroni, A., Liu, T., Fitzgerald, M. L., Freeman, M. W. and Zannis, V. I. 2004b. Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. - *Biochemistry* 43: 2126-2139.
39. Chroni, A., Liu, T., Gorshkova, I., Kan, H. Y., Uehara, Y., von Eckardstein, A. and Zannis, V. I. 2003. The central helices of apoA-I can promote ATP-binding

- cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type apoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. - *J. Biol. Chem.* 278: 6719-6730.
40. Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I. P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J. C., Dallongeville, J., Hum, D. W., Kuipers, F. and Staels, B. 2002. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. - *J. Clin. Invest* 109: 961-971.
41. Clee, S. M., Kastelein, J. J., van Dam, M., Marcil, M., Roomp, K., Zwarts, K. Y., Collins, J. A., Roelants, R., Tamasawa, N., Stulc, T., Suda, T., Ceska, R., Boucher, B., Rondeau, C., DeSouich, C., Brooks-Wilson, A., Molhuizen, H. O., Frohlich, J., Genest, J., Jr. and Hayden, M. R. 2000. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. - *J. Clin. Invest* 106: 1263-1270.
42. Cohen, J. C., Kiss, R. S., Pertsemlidis, A., Marcel, Y. L., McPherson, R. and Hobbs, H. H. 2004. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. - *Science* 305: 869-872.
43. Croop, J. M., Tiller, G. E., Fletcher, J. A., Lux, M. L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S. and Wu, R. L. 1997. Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. - *Gene* 185: 77-85.
44. Daum, U., Langer, C., Duverger, N., Emmanuel, F., Benoit, P., Deneffe, P., Chirazi, A., Cullen, P., Pritchard, P. H., Bruckert, E., Assmann, G. and von

- Eckardstein, A. 1999a. Apolipoprotein A-I (R151C)Paris is defective in activation of lecithin: cholesterol acyltransferase but not in initial lipid binding, formation of reconstituted lipoproteins, or promotion of cholesterol efflux. - *J. Mol. Med.* 77: 614-622.
45. Daum, U., Leren, T. P., Langer, C., Chirazi, A., Cullen, P., Pritchard, P. H., Assmann, G. and von Eckardstein, A. 1999b. Multiple dysfunctions of two apolipoprotein A-I variants, apoA- I(R160L)Oslo and apoA-I(P165R), that are associated with hypoalphalipoproteinemia in heterozygous carriers. - *J. Lipid Res.* 40: 486-494.
46. Davidson, W. S. and Thompson, T. B. 2007. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. - *J Biol Chem.*
47. Delerive, P., Galardi, C. M., Bisi, J. E., Nicodeme, E. and Goodwin, B. 2004. Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI gene transcription. - *Mol. Endocrinol.* 18: 2378-2387.
48. Dietschy, J. M. and Turley, S. D. 2002. Control of cholesterol turnover in the mouse. - *J. Biol. Chem.* 277: 3801-3804.
49. Feng, B. and Tabas, I. 2002. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. - *J. Biol. Chem.* 277: 43271-43280.

50. Fielding, C. J. and Fielding, P. E. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. - *J. Lipid Res.* 36: 211-228.
51. Fielding, C. J. and Fielding, P. E. 1996. Two-dimensional nondenaturing electrophoresis of lipoproteins: applications to high-density lipoprotein speciation. - *Methods Enzymol.* 263: 251-259.
52. Fielding, C. J., Shore, V. G. and Fielding, P. E. 1972. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 1493-1498.
53. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Chroni, A., Mendez, A. J., Zannis, V. I. and Freeman, M. W. 2004a. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. - *J. Lipid Res.* 45: 287-294.
54. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Rhee, J. S., Andersson, L. P., Mendez, A. J. and Freeman, M. W. 2002. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. - *J. Biol. Chem.* 277: 33178-33187.
55. Fitzgerald, M. L., Okuhira, K., Short, G. F., III, Manning, J. J., Bell, S. A. and Freeman, M. W. 2004b. ATP-binding cassette transporter A1 contains a novel C-terminal VFVNFA motif that is required for its cholesterol efflux and ApoA-I binding activities. - *J. Biol. Chem.* 279: 48477-48485.

56. Forte, T. M., Subbanagounder, G., Berliner, J. A., Blanche, P. J., Clermont, A. O., Jia, Z., Oda, M. N., Krauss, R. M. and Bielicki, J. K. 2002. Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. - *Journal of Lipid Research* 43: 477-485.
57. Frank, P. G. and Marcel, Y. L. 2000. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. - *J. Lipid Res.* 41: 853-872.
58. Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G., Jensen, G. B. and Tybjaerg-Hansen, A. 2004. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. - *J. Clin. Invest* 114: 1343-1353.
59. Funke, H., von Eckardstein, A., Pritchard, P. H., Albers, J. J., Kastelein, J. J., Droste, C. and Assmann, G. 1991. A molecular defect causing fish eye disease: an amino acid exchange in lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) leads to the selective loss of alpha-LCAT activity. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 4855-4859.
60. Ge, R., Rhee, M., Malik, S. and Karathanasis, S. K. 1994. Transcriptional repression of apolipoprotein AI gene expression by orphan receptor ARP-1. - *Journal of Biological Chemistry* 269: 13185-13192.
61. Goldstein, J. L., Hobbs, H. H. and Brown, M. S. 2001. Familial hypercholesterolemia. - In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D. and Sly, W.



- S. (eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw Hill, pp. 2863-2913.
62. Gordon, D. J. and Rifkind, B. M. 1989. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. - *N. Engl. J. Med.* 321: 1311-1316.
63. Gorshkova, I. N., Liu, T., Kan, H. Y., Chroni, A., Zannis, V. I. and Atkinson, D. 2006. Structure and stability of apolipoprotein a-I in solution and in discoidal high-density lipoprotein probed by double charge ablation and deletion mutation. - *Biochemistry* 45: 1242-1254.
64. Gotto, A. M., Jr., Pownall, H. J. and Havel, R. J. 1986. Introduction to the plasma lipoproteins. - *Methods Enzymol.* 128: 3-41.
65. Gylling, H. and Miettinen, T. A. 1992. Noncholesterol Sterols, Absorption and Synthesis of Cholesterol and Apolipoprotein-A-I Kinetics in A Finnish Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Deficient Family. - *Atherosclerosis* 95: 25-33.
66. Haghpassand, M., Bourassa, P. A., Francone, O. L. and Aiello, R. J. 2001. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. - *J. Clin. Invest* 108: 1315-1320.
67. Hammad, S. M., Stefansson, S., Twal, W. O., Drake, C. J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer, H. B., Jr. and Argraves, W. S. 1999. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 10158-10163.

68. Harnish, D. C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R. and Karathanasis, S. K. 1996. Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4. - *Journal of Biological Chemistry* 271: 13621-13628.
69. Heller, M., Schlappritzi, E., Stalder, D., Nuoffer, J. M. and Haerberli, A. 2007. Compositional protein analysis of high-density lipoproteins in hypercholesterolemia by shotgun LC-MS/MS and probabilistic peptide scoring. - *Mol Cell Proteomics*.
70. Heller, M., Stalder, D., Schlappritzi, E., Hayn, G., Matter, U. and Haerberli, A. 2005. Mass spectrometry-based analytical tools for the molecular protein characterization of human plasma lipoproteins. - *Proteomics*. 5: 2619-2630.
71. Hennessy, L. K., Kunitake, S. T. and Kane, J. P. 1993. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre-beta high-density lipoprotein particles. - *Biochemistry* 32: 5759-5765.
72. Hessler, J. R., Robertson, A. L. and Chisolm, 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.
73. Hirata, K., Dichek, H. L., Cioffi, J. A., Choi, S. Y., Leeper, N. J., Quintana, L., Kronmal, G. S., Cooper, A. D. and Quertermous, T. 1999. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. - *J. Biol. Chem.* 274: 14170-14175.

74. Hovingh, G. K., Brownlie, A., Bisoendial, R. J., Dube, M. P., Levels, J. H., Petersen, W., Dullaart, R. P., Stroes, E. S., Zwinderman, A. H., de Groot, E., Hayden, M. R., Kuivenhoven, J. A. and Kastelein, J. J. 2004. A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. - *J. Am. Coll. Cardiol.* 44: 1429-1435.
75. Huuskonen, J., Olkkonen, V. M., Jauhiainen, M. and Ehnholm, C. 2001. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. - *Atherosclerosis* 155: 269-281.
76. Huuskonen, J., Vishnu, M., Chau, P., Fielding, P. E. and Fielding, C. J. 2006. Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells. - *Biochemistry* 45: 15068-15074.
77. Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J., Takata, K., Maruhama, Y., Mabuchi, H. and Tall, A. R. 1990. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. - *N. Engl. J. Med.* 323: 1234-1238.
78. Ishida, T., Choi, S., Kundu, R. K., Hirata, K., Rubin, E. M., Cooper, A. D. and Quertermous, T. 2003. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. - *J. Clin. Invest* 111: 347-355.
79. Ishida, T., Choi, S. Y., Kundu, R. K., Spin, J., Yamashita, T., Hirata, K., Kojima, Y., Yokoyama, M., Cooper, A. D. and Quertermous, T. 2004. Endothelial lipase

- modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. - J. Biol. Chem. 279: 45085-45092.
80. Jaye, M., Lynch, K. J., Krawiec, J., Marchadier, D., Maugeais, C., Doan, K., South, V., Amin, D., Perrone, M. and Rader, D. J. 1999. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. - Nat. Genet. 21: 424-428.
81. Jiang, X. C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O. L. and Tall, A. R. 1999. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. - J. Clin. Invest 103: 907-914.
82. Jiang, X. C., Qin, S., Qiao, C., Kawano, K., Lin, M., Skold, A., Xiao, X. and Tall, A. R. 2001. Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. - Nat. Med. 7: 847-852.
83. Jonas, A. 1998. Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. - Prog. Lipid Res. 37: 209-234.
84. Jonas, A., Daehler, J. L. and Wilson, E. R. 1986. Anion Effects on the Reaction of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase with Discoidal Complexes of "Phosphatidylcholines. Apolipoprotein A-I. Cholesterol. - Biochimica et Biophysica Acta 876: 474-485.
85. Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G. N., Tran, J., Tippin, T. K., Wang, X., Lusis, A. J., Hsueh, W. A., Law, R. E., Collins, J. L., Willson, T. M.

- and Tontonoz, P. 2002. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 7604-7609.
86. Kan, H. Y., Georgopoulos, S., Zanni, M., Shkodrani, A., Tzatsos, A., Xie, H. X. and Zannis, V. I. 2004. Contribution of the hormone-response elements of the proximal ApoA-I promoter, ApoCIII enhancer, and C/EBP binding site of the proximal ApoA-I promoter to the hepatic and intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes in transgenic mice. - *Biochemistry* 43: 5084-5093.
87. Kan, H. Y., Georgopoulos, S. and Zannis, V. 2000. A hormone response element in the human apolipoprotein CIII (ApoCIII) enhancer is essential for intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes and contributes to the hepatic expression of the two linked genes in transgenic mice. - *J. Biol. Chem.* 275: 30423-30431.
88. Kane, J. P. and Havel, R. J. 1989. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. - In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D. (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, pp. 1139-1164.
89. Kane, J. P. and Havel, R. J. 2001. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. - In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D. and Sly, W. S. (eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, pp. 2717-2752.

90. Karathanasis, S. K., McPherson, J., Zannis, V. I. and Breslow, J. L. 1983a. Linkage of human apolipoproteins A-I and C-III genes. - *Nature* 304: 371-373.
91. Karathanasis, S. K., Zannis, V. I. and Breslow, J. L. 1983b. Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80: 6147-6151.
92. Kardassis, D., Pardali, K. and Zannis, V. I. 2000. SMAD proteins transactivate the human ApoCIII promoter by interacting physically and functionally with hepatocyte nuclear factor 4. - *J. Biol. Chem.* 275: 41405-41414.
93. Kardassis, D., Tzamelis, I., Hadzopoulou-Cladaras, M., Talianidis, I. and Zannis, V. 1997. Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer for proximal promoters that contain hormone response elements. Synergism between hepatic nuclear factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 222-232.
94. Kennedy, M. A., Barrera, G. C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M. C., Frank, J., Francone, O. L. and Edwards, P. A. 2005. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. - *Cell Metab* 1: 121-131.
95. Kielar, D., Dietmaier, W., Langmann, T., Aslanidis, C., Probst, M., Naruszewicz, M. and Schmitz, G. 2001. Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in

- various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. - Clin. Chem. 47: 2089-2097.
96. Klon, A. E., Jones, M. K., Segrest, J. P. and Harvey, S. C. 2000. Molecular belt models for the apolipoprotein A-I Paris and Milano mutations. - Biophys. J. 79: 1679-1685.
  97. Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W. E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R. and Schmitz, G. 2000. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97: 817-822.
  98. Ko, K. W. S., Paul, A., Ma, K., Li, L. and Chan, L. 2005. Endothelial lipase modulates HDL but has no effect on atherosclerosis development in apoE<sup>-/-</sup> and LDLR<sup>-/-</sup> mice. - Journal of Lipid Research 46: 2586-2594.
  99. Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E. I., Aminoff, M., de la, C. A., Krahe, R., Verroust, P. J. and Moestrup, S. K. 1999. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. - Nat. Med. 5: 656-661.
  100. Kunitake, S. T., La Sala, K. J. and Kane, J. P. 1985. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. - J. Lipid Res. 26: 549-555.

101. Laccotripe, M., Makrides, S. C., Jonas, A. and Zannis, V. I. 1997. The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein. - *J. Biol. Chem.* 272: 17511-17522.
102. Ladias, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V. and Cladaras, C. 1992. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. - *J. Biol. Chem.* 267: 15849-15860.
103. 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.
104. Law, S. W. and Brewer, H. B., Jr. 1984. Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human apolipoprotein A-I mRNA. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81: 66-70.
105. Le Goff, W., Zheng, P., Brubaker, G. and Smith, J. D. 2006. Identification of the cAMP-Responsive Enhancer of the Murine ABCA1 Gene: Requirement for CREB1 and STAT3/4 Elements. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 527-533.
106. Leren, T. P., Bakken, K. S., Daum, U., Ose, L., Berg, K., Assmann, G. and von Eckardstein, A. 1997. Heterozygosity for apolipoprotein A-I(R160L)Oslo is



- associated with low levels of high density lipoprotein cholesterol and HDL-subclass LpA-I/A-II but normal levels of HDL-subclass LpA-I. - *J. Lipid Res.* 38: 121-131.
107. Levin, N., Bischoff, E. D., Daige, C. L., Thomas, D., Vu, C. T., Heyman, R. A., Tangirala, R. K. and Schulman, I. G. 2005. Macrophage Liver X Receptor Is Required for Antiatherogenic Activity of LXR Agonists. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 135-142.
108. Liang, H. Q., Rye, K. A. and Barter, P. J. 1994. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. - *J. Lipid Res.* 35: 1187-1199.
109. Luciani, M. F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M. G. and Chimini, G. 1994. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. - *Genomics* 21: 150-159.
110. Lund, E. G., Menke, J. G. and Sparrow, C. P. 2003. Liver X receptor agonists as potential therapeutic agents for dyslipidemia and atherosclerosis. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 1169-1177.
111. Lund, E. G., Peterson, L. B., Adams, A. D., Lam, M. H., Burton, C. A., Chin, J., Guo, Q., Huang, S., Latham, M., Lopez, J. C., Menke, J. G., Milot, D. P., Mitnaul, L. J., Rex-Rabe, S. E., Rosa, R. L., Tian, J. Y., Wright, S. D. and Sparrow, C. P. 2006. Different roles of liver X receptor [alpha] and [beta] in lipid metabolism: Effects of an [alpha]-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. - *Biochemical Pharmacology* 71: 453-463.

112. Lusa, S., Jauhiainen, M., Metso, J., Somerharju, P. and Ehnholm, C. 1996. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. - *Biochem. J.* 313 ( Pt 1): 275-282.
113. Lusis, A. J., Taylor, B. A., Wangenstein, R. W. and LeBoeuf, R. C. 1983. Genetic-Control of Lipid Transport in Mice .2. Genes-Controlling Structure of High-Density Lipoproteins. - *Journal of Biological Chemistry* 258: 5071-5078.
114. Ma, K., Cilingiroglu, M., Otvos, J. D., Ballantyne, C. M., Marian, A. J. and Chan, L. 2003. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 2748-2753.
115. Major, A. S., Dove, D. E., Ishiguro, H., Su, Y. R., Brown, A. M., Liu, L., Carter, K. J., Linton, M. F. and Fazio, S. 2001. Increased cholesterol efflux in apolipoprotein AI (ApoAI)-producing macrophages as a mechanism for reduced atherosclerosis in ApoAI((-/-)) mice. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1790-1795.
116. Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S. M., Roomp, K., Zhang, L. H., Yu, L., Collins, J. A., van Dam, M., Molhuizen, H. O., Loubster, O., Ouellette, B. F., Sensen, C. W., Fichter, K., Mott, S., Denis, M., Boucher, B., Pimstone, S., Genest, J., Jr., Kastelein, J. J. and Hayden, M. R. 1999. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. - *Lancet* 354: 1341-1346.

117. Martin, D. D., Budamagunta, M. S., Ryan, R. O., Voss, J. C. and Oda, M. N. 2006. Apolipoprotein A-I assumes a looped belt conformation on reconstituted high density lipoprotein. - *J. Biol. Chem.*
118. Martinez, L. O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W. and Tall, A. R. 2003. Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. - *J. Biol. Chem.* 278: 37368-37374.
119. Matsunaga, T., Hiasa, Y., Yanagi, H., Maeda, T., Hattori, N., Yamakawa, K., Yamanouchi, Y., Tanaka, I., Obara, T. and Hamaguchi, H. 1991. Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 2793-2797.
120. Matsuura, F., Wang, N., Chen, W., Jiang, X. C. and Tall, A. R. 2006. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. - *J. Clin. Invest.* 116: 1435-1442.
121. Matz, C. E. and Jonas, A. 1982. Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. - *J. Biol. Chem.* 257: 4535-4540.
122. McLean, J., Fielding, C., Drayna, D., Dieplinger, H., Baer, B., Kohr, W., Henzel, W. and Lawn, R. 1986a. Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83: 2335-2339.

123. McLean, J., Wion, K., Drayna, D., Fielding, C. and Lawn, R. 1986b. Human lecithin-cholesterol acyltransferase gene: complete gene sequence and sites of expression. - *Nucleic Acids Res.* 14: 9397-9406.
124. McManus, D. C., Scott, B. R., Frank, P. G., Franklin, V., Schultz, J. R. and Marcel, Y. L. 2000. Distinct central amphipathic alpha-helices in apolipoprotein A-I contribute to the in vivo maturation of high density lipoprotein by either activating lecithin-cholesterol acyltransferase or binding lipids. - *J. Biol. Chem.* 275: 5043-5051.
125. McManus, D. C., Scott, B. R., Franklin, V., Sparks, D. L. and Marcel, Y. L. 2001. Proteolytic degradation and impaired secretion of an apolipoprotein A-I mutant associated with dominantly inherited hypoalphalipoproteinemia. - *J. Biol. Chem.* 276: 21292-21302.
126. McNeish, J., Aiello, R. J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K. L., Roach, M. L., Royer, L. J., de Wet, J., Broccardo, C., Chimini, G. and Francone, O. L. 2000. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97: 4245-4250.
127. Miccoli, R., Bertolotto, A., Navalesi, R., Odoguardi, L., Boni, A., Wessling, J., Funke, H., Wiebusch, H., Eckardstein, A. and Assmann, G. 1996. Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I(L141R)Pisa, and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications, and coronary heart disease. - *Circulation* 94: 1622-1628.

128. Miccoli, R., Zhu, Y., Daum, U., Wessling, J., Huang, Y., Navalesi, R., Assmann, G. and von Eckardstein, A. 1997. A natural apolipoprotein A-I variant, apoA-I (L141R)Pisa, interferes with the formation of alpha-high density lipoproteins (HDL) but not with the formation of pre beta 1-HDL and influences efflux of cholesterol into plasma. - *Journal of Lipid Research* 38: 1242.
129. Miettinen, H. E., Gylling, H., Miettinen, T. A., Viikari, J., Paulin, L. and Kontula, K. 1997a. Apolipoprotein A-IFin. Dominantly inherited hypoalphalipoproteinemia due to a single base substitution in the apolipoprotein A-I gene. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 83-90.
130. Miettinen, H. E., Jauhiainen, M., Gylling, H., Ehnholm, S., Palomaki, A., Miettinen, T. A. and Kontula, K. 1997b. Apolipoprotein A-IFIN (Leu159-->Arg) mutation affects lecithin cholesterol acyltransferase activation and subclass distribution of HDL but not cholesterol efflux from fibroblasts. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 3021-3032.
131. Moore, R. E., Navab, M., Millar, J. S., Zimetti, F., Hama, S., Rothblat, G. H. and Rader, D. J. 2005. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation. - *Circ. Res.* 97: 763-771.
132. Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C. H. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. - *J. Cell Sci.* 114: 4359-4369.

133. Munehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S., Amachi, T., Matsuo, M., Kioka, N. and Ueda, K. 2004. Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. - J. Biol. Chem. 279: 15091-15095.
134. Nagarajan, R. P., Zhang, J., Li, W. and Chen, Y. 1999. Regulation of Smad7 Promoter by Direct Association with Smad3 and Smad4. - Journal of Biological Chemistry 274: 33412-33418.
135. Nakamura, K., Kennedy, M. A., Baldan, A., Bojanic, D. D., Lyons, K. and Edwards, P. A. 2004. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. - J. Biol. Chem. 279: 45980-45989.
136. Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Hama, S., Hough, G., Grijalva, V. R., Wagner, A. C., Frank, J. S., Datta, G., Garber, D. and Fogelman, A. M. 2004. Oral D-4F Causes Formation of Pre-beta High-Density Lipoprotein and Improves High-Density Lipoprotein-Mediated Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport From Macrophages in Apolipoprotein E-Null Mice. - Circulation.
137. Navab, M., Ananthramaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Ansell, B. J., Hama, S., Hough, G., Bachini, E., Grijalva, V. R., Wagner, A. C., Shaposhnik, Z. and Fogelman, A. M. 2005a. The double jeopardy of HDL. - Ann. Med. 37: 173-178.

138. Navab, M., Berliner, J. A., Subbanagounder, G., Hama, S., Lusis, A. J., Castellani, L. W., Reddy, S., Shih, D., Shi, W., Watson, A. D., Van Lenten, B. J., Vora, D. and Fogelman, A. M. 2001. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 481-488.
139. Navab, M., Hama, S., Hough, G., Reddy, S., Anantharamaiah, M. and Fogelman, A. 2003. Oral administration of the apoA-I mimetic peptide D-4F causes the rapid formation and clearance of small anti-inflammatory HDL-like particles in mice. - *Circulation* 108: 232.
140. Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Hama, S., Garber, D. W., Chaddha, M., Hough, G., Lallone, R. and Fogelman, A. M. 2002. Oral Administration of an Apo A-I Mimetic Peptide Synthesized From D-Amino Acids Dramatically Reduces Atherosclerosis in Mice Independent of Plasma Cholesterol. - *Circulation* 105: 290-292.
141. Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Hama, S., Hough, G., Reddy, S. T., Frank, J. S., Garber, D. W., Handattu, S. and Fogelman, A. M. 2005b. D-4F and Statins Synergize to Render HDL Antiinflammatory in Mice and Monkeys and Cause Lesion Regression in Old Apolipoprotein E-Null Mice. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1426-1432.
142. Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Hama, S., Hough, G., Frank, J. S., Grijalva, V. R., Ganesh, V. K., Mishra, V. K., Palgunachari, M. N. and Fogelman, A. M. 2005c. Oral Small Peptides Render HDL Antiinflammatory in

- Mice and Monkeys and Reduce Atherosclerosis in ApoE Null Mice. - *Circ Res* 97: 524-532.
143. Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Wagner, A. C., Hama, S., Hough, G., Bachini, E., Garber, D. W., Mishra, V. K., Palgunachari, M. N. and Fogelman, A. M. 2005d. An Oral ApoJ Peptide Renders HDL Antiinflammatory in Mice and Monkeys and Dramatically Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Null Mice. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1932-1937.
144. Neufeld, E. B., Demosky, S. J., Jr., Stonik, J. A., Combs, C., Remaley, A. T., Duverger, N., Santamarina-Fojo, S. and Brewer, H. B., Jr. 2002. The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297: 974-979.
145. Neufeld, E. B., Stonik, J. A., Demosky, S. J., Jr., Knapper, C. L., Combs, C. A., Cooney, A., Comly, M., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Remaley, A. T., Santamarina-Fojo, S. and Brewer, H. B., Jr. 2004. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. - *J. Biol. Chem.* 279: 15571-15578.
146. Nichols, W. C., Dwulet, F. E., Liepnieks, J. and Benson, M. D. 1988. Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156: 762-768.



147. Nissen, S. E., Tardif, J. C., Nicholls, S. J., Revkin, J. H., Shear, C. L., Duggan, W. T., Ruzyllo, W., Bachinsky, W. B., Lasala, G. P., Tuzcu, E. M. and the I, I 2007. Effect of Torcetrapib on the Progression of Coronary Atherosclerosis. - *N Engl J Med* 356: 1304-1316.
148. Nolte, R. T. and Atkinson, D. 1992. Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. - *Biophys. J.* 63: 1221-1239.
149. Norum, R. A., Lakier, J. B., Goldstein, S., Angel, A., Goldberg, R. B., Block, W. D., Noffze, D. K., Dolphin, P. J., Edelglass, J., Bogorad, D. D. and Alaupovic, P. 1982. Familial deficiency of apolipoproteins A-I and C-III and precocious coronary-artery disease. - *N Engl J Med* 306: 1513-1519.
150. Oldfield, S., Lowry, C., Ruddick, J. and Lightman, S. 2002. ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye. - *Biochim. Biophys. Acta* 1591: 175-179.
151. Oram, J. F. 2003. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 720-727.
152. Oram, J. F. and Vaughan, A. M. 2000. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. - *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 253-260.
153. Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W. E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., Spruss, T., Luciani,

- M. F., Rothe, G., Lackner, K. J., Chimini, G. and Schmitz, G. 2000. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. - *Nat. Genet.* 24: 192-196.
154. Panagotopoulos, S. E., Witting, S. R., Horace, E. M., Hui, D. Y., Maiorano, J. N. and Davidson, W. S. 2002. The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1. - *J. Biol. Chem.* 277: 39477-39484.
155. Peng, D. Q., Wu, Z., Brubaker, G., Zheng, L., Settle, M., Gross, E., Kinter, M., Hazen, S. L. and Smith, J. D. 2005. Tyrosine Modification Is Not Required for Myeloperoxidase-induced Loss of Apolipoprotein A-I Functional Activities. - *Journal of Biological Chemistry* 280: 33775-33784.
156. Pennathur, S., Bergt, C., Shao, B., Byun, J., Kassim, S. Y., Singh, P., Green, P. S., McDonald, T. O., Brunzell, J., Chait, A., Oram, J. F., O'Brien, K., Geary, R. L. and Heinecke, J. W. 2004. Human Atherosclerotic Intima and Blood of Patients with Established Coronary Artery Disease Contain High Density Lipoprotein Damaged by Reactive Nitrogen Species. - *Journal of Biological Chemistry* 279: 42977-42983.
157. Pisciotta, L., Miccoli, R., Cantafora, A., Calabresi, L., Tarugi, P., Alessandrini, P., Bittolo, B. G., Franceschini, G., Cortese, C., Calandra, S. and Bertolini, S. 2003. Recurrent mutations of the apolipoprotein A-I gene in three kindreds with severe HDL deficiency. - *Atherosclerosis* 167: 335-345.

158. Rader, D. J., Gregg, R. E., Meng, M. S., Schaefer, J. R., Zech, L. A., Benson, M. D. and Brewer, H. B., Jr. 1992. In vivo metabolism of a mutant apolipoprotein, apoA-IIowa, associated with hypoalphalipoproteinemia and hereditary systemic amyloidosis. - *J. Lipid Res.* 33: 755-763.
159. Rader, D. J. and Jaye, M. 2000. Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. - *Curr Opin Lipidol.* 11: 141-147.
160. Reardon, C. A., Kan, H. Y., Cabana, V., Blachowicz, L., Lukens, J. R., Wu, Q., Liadaki, K., Getz, G. S. and Zannis, V. I. 2001. In vivo studies of HDL assembly and metabolism using adenovirus-mediated transfer of ApoA-I mutants in ApoA-I-deficient mice. - *Biochemistry* 40: 13670-13680.
161. 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., Jr. 2001. Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 818-823.
162. Rezaee, F., Casetta, B., Levels, J. H., Speijer, D. and Meijers, J. C. 2006. Proteomic analysis of high-density lipoprotein. - *Proteomics.* 6: 721-730.
163. Rigot, V., Hamon, Y., Chambenoit, O., Alibert, M., Duverger, N. and Chimini, G. 2002. Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids. - *J. Lipid Res.* 43: 2077-2086.

164. Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. and Krieger, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 12610-12615.
165. Roghani, A. and Zannis, V. I. 1988. Alterations of the glutamine residues of human apolipoprotein AI propeptide by in vitro mutagenesis. Characterization of the normal and mutant protein forms. - *Biochemistry* 27: 7428-7435.
166. Roma, P., Gregg, R. E., Meng, M. S., Ronan, R., Zech, L. A., Franceschini, G., Sirtori, C. R. and Brewer, H. B., Jr. 1993. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A- IMilano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. - *J. Clin. Invest* 91: 1445-1452.
167. Roosbeek, S., Peelman, F., Verhee, A., Labeur, C., Caster, H., Lensink, M. F., Cirulli, C., Grooten, J., Cochet, C., Vandekerckhove, J., Amoresano, A., Chimini, G., Tavernier, J. and Rosseneu, M. 2004. Phosphorylation by protein kinase CK2 modulates the activity of the ATP binding cassette A1 transporter. - *J. Biol. Chem.* 279: 37779-37788.
168. Roosbeek, S., Vanloo, B., Duverger, N., Caster, H., Breyne, J., De, B., I, Patel, H., Vandekerckhove, J., Shoulders, C., Rosseneu, M. and Peelman, F. 2001. Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. - *J. Lipid Res.* 42: 31-40.

169. Rothblat, G. H., Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D. L. and Phillips, M. C. 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. - *J. Lipid Res.* 40: 781-796.
170. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Deneffe, P. and Assmann, G. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. - *Nat. Genet.* 22: 352-355.
171. Santamarina-Fojo, S., Hoeg, J. M., Assmann, G. and Brewer, H. B., Jr. 2001. Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. - In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D. (eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, pp. 2817-2834.
172. Savary, S., Denizot, F., Luciani, M., Mattei, M. and Chimini, G. 1996. Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila* white gene. - *Mamm. Genome* 7: 673-676.
173. Schaefer, E. J., Blum, C. B., Levy, R. I., Jenkins, L. L., Alaupovic, P., Foster, D. M. and Brewer, H. B. 1978. Metabolism of high-density lipoprotein apolipoproteins in Tangier disease. - *N Engl J Med* 299: 905-910.
174. Schaefer, E. J., Ordovas, J. M., Law, S. W., Ghiselli, G., Kashyap, M. L., Srivastava, L. S., Heaton, W. H., Albers, J. J., Connor, W. E., Lindgren, F. T. and . 1985. Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency, variant II. - *J. Lipid Res.* 26: 1089-1101.

175. Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D. and Shan, B. 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. - *Genes Dev.* 14: 2831-2838.
176. Scott, B. R., McManus, D. C., Franklin, V., McKenzie, A. G., Neville, T., Sparks, D. L. and Marcel, Y. L. 2001. The N-terminal globular domain and the first class A amphipathic helix of apolipoprotein A-I are important for lecithin:cholesterol acyltransferase activation and the maturation of high density lipoprotein in vivo. - *J. Biol. Chem.* 276: 48716-48724.
177. Segrest, J. P., Jones, M. K., Klon, A. E., Sheldahl, C. J., Hellinger, M., De Loof, H. and Harvey, S. C. 1999. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. - *J. Biol. Chem.* 274: 31755-31758.
178. Segrest, J. P., Li, L., Anantharamaiah, G. M., Harvey, S. C., Liadaki, K. N. and Zannis, V. 2000. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. - *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 105-115.
179. Shah, P. K. and Chyu, K. Y. 2005. Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides: Potential Role in Atherosclerosis Management. - *Trends in Cardiovascular Medicine* 15: 291-296.
180. Shao, B., Oda, M. N., Bergt, C., Fu, X., Green, P. S., Brot, N., Oram, J. F. and Heinecke, J. W. 2006. Myeloperoxidase Impairs ABCA1-dependent Cholesterol Efflux through Methionine Oxidation and Site-specific Tyrosine Chlorination of Apolipoprotein A-I. - *Journal of Biological Chemistry* 281: 9001-9004.

181. Singaraja, R. R., Fievet, C., Castro, G., James, E. R., Hennuyer, N., Clee, S. M., Bissada, N., Choy, J. C., Fruchart, J. C., McManus, B. M., Staels, B. and Hayden, M. R. 2002. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. - *J. Clin. Invest* 110: 35-42.
182. Singaraja, R. R., Van Eck, M., Bissada, N., Zimetti, F., Collins, H. L., Hildebrand, R. B., Hayden, A., Brunham, L. R., Kang, M. H., Fruchart, J. C., van Berkel, T. J., Parks, J. S., Staels, B., Rothblat, G. H., Fievet, C. and Hayden, M. R. 2006a. Both Hepatic and Extrahepatic ABCA1 Have Discrete and Essential Functions in the Maintenance of Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels In Vivo. - *Circulation* 114: 1301-1309.
183. Singaraja, R. R., Visscher, H., James, E. R., Chroni, A., Coutinho, J. M., Brunham, L. R., Kang, M. H., Zannis, V. I., Chimini, G. and Hayden, M. R. 2006b. Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro. - *Circ. Res.* 99: 389-397.
184. Sorci-Thomas, M. G. and Thomas, M. J. 2002. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. - *Trends Cardiovasc. Med.* 12: 121-128.
185. Sviridov, D., Hoang, A., Sawyer, W. H. and Fidge, N. H. 2000. Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the activation of Lecithin:Cholesterol acyltransferase. - *J. Biol. Chem.* 275: 19707-19712.

186. Talianidis, I., Tambakaki, A., Toursounova, J. and Zannis, V. I. 1995. Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human APOCIII gene. - *Biochemistry* 34: 10298-10309.
187. Tall, A. R., Breslow, J. L. and Rubin, E. M. 2001. Genetic disorders affecting plasma high-density lipoproteins. - In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D. and Sly, W. S. (eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, pp. 2915-2936.
188. Tangirala, R. K., Bischoff, E. D., Joseph, S. B., Wagner, B. L., Walczak, R., Laffitte, B. A., Daige, C. L., Thomas, D., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Wang, X., Lusis, A. J., Tontonoz, P. and Schulman, I. G. 2002. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 11896-11901.
189. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N. and Parks, J. S. 2005. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. - *J. Clin. Invest* 115: 1333-1342.
190. Tontonoz, P. and Mangelsdorf, D. J. 2003. Liver X Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Disease. - *Mol Endocrinol* 17: 985-993.



191. Trigatti, B., Covey, S. and Rizvi, A. 2004. Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. - *Biochem Soc Trans* 32: 116-120.
192. Tzamelis, I. and Zannis, V. I. 1996. Binding specificity and modulation of the ApoA-I promoter activity by homo- and heterodimers of nuclear receptors. - *J. Biol. Chem.* 271: 8402-8415.
193. Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P. S., Gharib, S. A., Hoofnagle, A. N., Cheung, M. C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., Chea, H., Knopp, R. H., Brunzell, J., Geary, R., Chait, A., Zhao, X. Q., Elkon, K., Marcovina, S., Ridker, P., Oram, J. F. and Heinecke, J. W. 2007. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. - *J. Clin. Invest.* 117: 746-756.
194. Vaisman, B. L., Lambert, G., Amar, M., Joyce, C., Ito, T., Shamburek, R. D., Cain, W. J., Fruchart-Najib, J., Neufeld, E. D., Remaley, A. T., Brewer, H. B., Jr. and Santamarina-Fojo, S. 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. - *J. Clin. Invest* 108: 303-309.
195. Van Eck, M., Bos, I. S., Kaminski, W. E., Orso, E., Rothe, G., Twisk, J., Bottcher, A., Van Amersfoort, E. S., Christiansen-Weber, T. A., Fung-Leung, W. P., van Berkel, T. J. and Schmitz, G. 2002. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 6298-6303.

196. Van Eck, M., Bos, I. S., Hildebrand, R. B., Van Rij, B. T. and Van Berkel, T. J. C. 2004. Dual Role for Scavenger Receptor Class B, Type I on Bone Marrow-Derived Cells in Atherosclerotic Lesion Development. - *Am J Pathol* 165: 785-794.
197. Van Lenten, B. J., Hama, S. Y., de Beer, F. C., Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., La Du, B. N., Fogelman, A. M. and Navab, M. 1995. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. - *J. Clin. Invest* 96: 2758-2767.
198. Vaughan, A. M. and Oram, J. F. 2003. ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. - *J. Lipid Res.* 44: 1373-1380.
199. Vaughan, A. M. and Oram, J. F. 2005. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by HDL but not by lipid-depleted apolipoproteins. - *J. Biol. Chem.* 280: 30150-30157.
200. Vedhachalam, C., Ghering, A. B., Davidson, W. S., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H. and Phillips, M. C. 2007. ABCA1-Induced Cell Surface Binding Sites for ApoA-I. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ATVBAHA.
201. Venkateswaran, A., Repa, J. J., Lobaccaro, J. M., Bronson, A., Mangelsdorf, D. J. and Edwards, P. A. 2000. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly

- induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. - *J. Biol. Chem.* 275: 14700-14707.
202. von Eckardstein, A., Langer, C., Engel, T., Schaukal, I., Cignarella, A., Reinhardt, J., Lorkowski, S., Li, Z., Zhou, X., Cullen, P. and Assmann, G. 2001. ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. - *FASEB J.* 15: 1555-1561.
203. Wang, M. D., Franklin, V. and Marcel, Y. L. 2007. In Vivo Reverse Cholesterol Transport From Macrophages Lacking ABCA1 Expression Is Impaired. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
204. Wang, N., Chen, W., Linsel-Nitschke, P., Martinez, L. O., Agerholm-Larsen, B., Silver, D. L. and Tall, A. R. 2003. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. - *J. Clin. Invest* 111: 99-107.
205. Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F. and Tall, A. R. 2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 9774-9779.
206. Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F. and Tall, A. R. 2006. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. - *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1310-1316.

207. Wang, N., Silver, D. L., Costet, P. and Tall, A. R. 2000. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. - *J. Biol. Chem.* 275: 33053-33058.
208. Wang, Y. and Oram, J. F. 2002. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. - *J. Biol. Chem.* 277: 5692-5697.
209. Wellington, C. L., Brunham, L. R., Zhou, S., Singaraja, R. R., Visscher, H., Gelfer, A., Ross, C., James, E., Liu, G., Huber, M. T., Yang, Y. Z., Parks, R. J., Groen, A., Fruchart-Najib, J. and Hayden, M. R. 2003. Alterations of plasma lipids in mice via adenoviral-mediated hepatic overexpression of human ABCA1. - *J. Lipid Res.* 44: 1470-1480.
210. 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.
211. Yamauchi, Y., Hayashi, M., Abe-Dohmae, S. and Yokoyama, S. 2003. Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. - *J. Biol. Chem.* 278: 47890-47897.
212. Yancey, P. G., Bortnick, A. E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. 2003. Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux. - *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 712-719.

213. Yesilaltay, A., Morales, M. G., Amigo, L., Zanlungo, S., Rigotti, A., Karackattu, S. L., Donahee, M. H., Kozarsky, K. F. and Krieger, M. 2006. Effects of hepatic expression of the high-density lipoprotein receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and female fertility. - *Endocrinology* 147: 1577-1588.
214. 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.
215. Zannis, V. I., Chroni, A., Kypreos, K. E., Kan, H. Y., Cesar, T. B., Zanni, E. E. and Kardassis, D. 2004a. Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer. - *Curr Opin Lipidol.* 15: 151-166.
216. Zannis, V. I., Kan, H. Y., Kritsis, A., Zanni, E. E. and Kardassis, D. 2001. Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. - *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 181-207.
217. Zannis, V. I., Karathanasis, S. K., Keutmann, H. T., Goldberger, G. and Breslow, J. L. 1983. Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80: 2574-2578.
218. Zannis, V. I., Kardassis, D. and Zanni, E. E. 1993. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. - *Adv. Hum. Genet.* 21: 145-319.

219. Zannis, V. I., Kypreos, K. E., Chroni, A., Kardassis, D. and Zanni, E. E. 2004b. Lipoproteins and atherogenesis. - In: Loscalzo, J. (ed.), *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis*. Taylor & Francis, pp. 111-174.
220. Zannis, V. I., Lees, A. M., Lees, R. S. and Breslow, J. L. 1982. Abnormal apoprotein A-I isoprotein composition in patients with Tangier disease. - *J. Biol. Chem.* 257: 4978-4986.
221. Zhang, Y., Zanotti, I., Reilly, M. P., Glick, J. M., Rothblat, G. H. and Rader, D. J. 2003. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. - *Circulation* 108: 661-663.
222. Zheng, L., Settle, M., Brubaker, G., Schmitt, D., Hazen, S. L., Smith, J. D. and Kinter, M. 2005. Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. - *J. Biol. Chem.* 280: 38-47.
223. Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M. L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M., Schmitt, D., Fu, X., Thomson, L., Fox, P. L., Ischiropoulos, H., Smith, J. D., Kinter, M. and Hazen, S. L. 2004. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. - *J. Clin. Invest.* 114: 529-541.

# **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

**LCAT can rescue the abnormal phenotype produced by the natural apoA-I mutations (Leu141Arg)Pisa and (Leu159Arg)FIN**

Journal:	<i>Biochemistry</i>
Manuscript ID:	bi-2007-003203.R1
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	22-May-2007
Complete List of Authors:	Koukos, Georgios; Boston University School of Medicine, Medicine, Molecular Genetics Chroni, Angeliki; EKEFE "Demokritos", Institute of Biology Duka, Adelina; Boston University School of Medicine, Medicine, Molecular Genetics Kardassis, Dimitris; University of Crete Medical School, Department of Biochemistry, Division of Basic Sciences Zannis, Vassilis; Boston University School of Medicine, Medicine, Molecular Genetics





1  
2  
3 **LCAT can rescue the abnormal phenotype produced by the natural apoA-I mutations**  
4 **(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and (Leu159Arg)<sub>FIN</sub>**  
5  
6  
7  
8  
9

10 †This work was supported by the National Institutes of Health Grant (HL48739) and the 6<sup>th</sup>  
11 Framework Programme of the European Union (No. LSHM-CT-2006-037631).  
12  
13  
14  
15

16  
17 Georgios Koukos<sup>‡§||</sup>, Angeliki Chroni<sup>⊥</sup>, Adelina Duka<sup>‡</sup>, Dimitris Kardassis<sup>§||</sup>, and Vassilis I.  
18 Zannis<sup>‡\*</sup>  
19  
20  
21  
22  
23

24 ‡Molecular Genetics, Departments of Medicine and Biochemistry, Whitaker Cardiovascular  
25 Institute, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118; §Department of Basic  
26 Sciences, University of Crete Medical School, Heraklion, GR-71110, Greece; ||Department  
27 of Biology, University of Crete, Greece; ⊥Institute of Biology, National Center for Scientific  
28 Research “Demokritos”, 15310 Agia Paraskevi, Athens, Greece; ¶Institute of Molecular  
29 Biology and Biotechnology, FORTH, Heraklion, Crete, Greece  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

41 Running Title: Molecular etiology of apoA-I<sub>Pisa</sub> and apoA-I<sub>Fin</sub>  
42  
43  
44

45 \*Vassilis Zannis, Molecular Genetics, Departments of Medicine and Biochemistry, Whitaker  
46 Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118-2394  
47  
48  
49  
50  
51 USA; Tel: 617-638-5085; Fax: 617-638-5141; Email: [vzannis@bu.edu](mailto:vzannis@bu.edu)  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 **Abbreviations:** ABCA1, ATP binding cassette transporter A1; apoA-I, apolipoprotein A-I;  
4 apoA-I<sup>-/-</sup> mice, apoA-I-deficient mice; BSA, bovine serum albumin; CE, cholesteryl ester;  
5  
6  
7  
8 CETP, cholesteryl ester transfer protein; cpt-cAMP, 8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3':5'-  
9  
10 cyclic monophosphate; EM, electron microscopy; FBS, fetal bovine serum; GFP, green  
11  
12 fluorescent protein; HDL, high density lipoprotein; LCAT, lecithin:cholesterol  
13  
14 acyltransferase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis;  
15  
16  
17 PBS, phosphate-buffered saline; pfu, plaque forming units; PLTP, phospholipid transfer  
18  
19 protein; SR-BI, scavenger receptor class B type I; TC, total cholesterol; WT, wild-type.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Abstract**

To explain the etiology and find a mode of therapy of genetically determined low levels of high density lipoprotein (HDL) levels, we have generated recombinant adenoviruses expressing apolipoprotein A-I (apoA-I)(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> and studied their properties *in vitro* and *in vivo*. Both mutants were secreted efficiently from cells but had diminished capacity to activate lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) *in vitro*. Adenovirus-mediated gene transfer of either of the two mutants in apoA-I-deficient (apoA-I<sup>-/-</sup>) mice resulted in greatly decreased total plasma cholesterol, apoA-I and HDL cholesterol levels. The treatment also decreased the cholesteryl ester to total cholesterol ratio (CE/TC), caused accumulation of pre $\beta$ 1-HDL and small size  $\alpha$ 4-HDL particles and generated only few spherical HDL particles, as compared to mice expressing wild-type (WT) apoA-I. Simultaneous treatment of the mice with adenoviruses expressing either of the two mutants and human LCAT normalized the plasma apoA-I, HDL cholesterol levels and the CE/TC ratio, restored normal pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL subpopulations and generated spherical HDL. The study establishes that apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> inhibit an early step in the biogenesis of HDL due to inefficient esterification of the cholesterol of the pre $\beta$ 1-HDL particles by the endogenous LCAT. Both defects can be corrected by treatment with LCAT.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

ApoA-I is the main protein component and is required for the biogenesis and the functions of HDL (2-4). HDL is synthesized through a complex pathway that involves various membrane-bound proteins, plasma enzymes and lipid transfer proteins (5). HDL assembles by an initial ABCA1-mediated transfer of cellular phospholipids and cholesterol to extracellular lipid-poor apoA-I acceptor. The initial lipidation of apoA-I is followed by the remodeling in the plasma compartment of the HDL particles by the esterification of cholesterol by the enzyme LCAT, the exchange between HDL and other lipoproteins of apolipoproteins and lipids, as well as the putative transfer of additional cellular cholesterol to the growing particles by the scavenger receptor class B type I (SR-BI) (6) and the cell surface transporter ABCG1 (7). Hydrolysis of lipids of HDL is mediated by various lipases (lipoprotein lipase, hepatic lipase, endothelial lipase) (5), and exchange of lipids by the phospholipid transfer protein (PLTP) (8) and by the cholesteryl ester transfer protein (CETP) (9).

Several naturally occurring apoA-I mutations that produce pathological phenotypes have been described (5;10-14). In recent studies, we have shown that mutations in apoA-I may affect different steps in the biogenesis of HDL or cause dyslipidemia (15-19). It has been estimated that structural mutations of apoA-I occur in 0.3% of the Japanese population and may affect the plasma HDL levels (20). From a total of 46 natural mutations of apoA-I, 25 are associated with low HDL levels and 17 of these mutants reduce the capacity of apoA-I to activate LCAT (5;12). These mutations are clustered predominantly in or at the vicinity of helix 4 of apoA-I (21) and some of them predispose to atherosclerosis (10;11;13;14;22).

In the current study we investigated the effect of two naturally occurring apoA-I mutations, apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, on the biogenesis of HDL. These mutations have been associated with very low HDL cholesterol and apoA-I levels as well as hypo- $\alpha$  lipoproteinemia in human subjects (13;22-27). Using adenovirus-mediated gene transfer of these mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice, we found that both mutations fail to form

1  
2  
3 discoidal or spherical HDL particles and are associated with very low plasma HDL levels.  
4  
5 These defects could be corrected by co-infection of mice with adenoviruses expressing the  
6  
7 mutant proteins along with human LCAT, indicating the endogenous LCAT was insufficient  
8  
9 to esterify the cholesterol of pre $\beta$ -HDL and thus to promote the sequential conversion of the  
10  
11 pre $\beta$  HDL particles to discoidal and spherical HDL particles.  
12  
13  
14  
15  
16

## 17 **Experimental Procedures**

18  
19  
20 **Materials:** Materials not mentioned in the *Experimental Procedures* have been obtained  
21  
22 from sources described previously (15;19).  
23

24  
25 **Generation of adenoviruses expressing the wild-type (WT) and the mutant apoA-I**  
26  
27 **forms.** Initially, the pUC19-apoAIg plasmid (28) was digested with BglII and treated with the  
28  
29 Klenow fragment of the DNA polymerase I to fill the recessed 3' end and ligated in order to  
30  
31 eliminate the BglII site. The derivative plasmid, designated pUC19-apoAIg( $\Delta$ BglII), was  
32  
33 used as a template to amplify by PCR the human apoA-I genomic sequence. For the  
34  
35 amplification a set of 5' and 3' flanking primers designated "apoAIg F" and "apoAIg R" was  
36  
37 used (Table 1). The first primer was designed to carry the XbaI (5'-TCTAGA-3') and BglII  
38  
39 (5'-AGATCT-3') recognition sites and the second primer carried the EcoRV (5'-GATATC-  
40  
41 3') recognition site incorporating them to the 5' and 3' of the apoA-I genomic sequence,  
42  
43 respectively. The product of the PCR was cloned into the pCDNA3.1 vector, resulting in the  
44  
45 generation of the vector pCDNA3.1-apoAIg( $\Delta$ BglII). The apoA-I mutants described in this  
46  
47 study were generated using the mutagenesis kit QuikChange® XL (Stratagene). The  
48  
49 mutagenic primers used are shown in Table 1. In all mutagenesis reactions the pCDNA3.1-  
50  
51 apoA-Ig( $\Delta$ BglII) vector containing the genomic sequence of the human apoA-I was used as a  
52  
53 template. Following 18 cycles of PCR amplification of the template DNA, the PCR product  
54  
55 was treated with DpnI to digest the parental plasmids containing methylated DNA in one or  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 both strands. The reaction product containing newly synthesized DNA carrying the mutations  
4 of interest was used to transform competent cells XL10-Gold® (Stratagene). Ampicillin-  
5 resistant clones were selected and plasmid DNA was isolated from these clones and subjected  
6 to sequencing to verify the presence of the desired point mutation. The plasmid containing  
7 the mutation of interest was digested with BglIII and EcoRV and the 2.2 kb insert was  
8 subcloned into the BglIII and EcoRV sites of the pAdTrackCMV vector to generate  
9 recombinant adenoviruses according to the Ad-Easy-1 system (Stratagene). The adenovirus  
10 construct was generated in bacteria BJ-5183-pAD1 (Stratagene). Correct clones were  
11 propagated in DH5a bacteria cells. The recombinant adenoviral vectors were linearized after  
12 incubation with PacI and used to transfect 911 cells. Following large-scale infection of  
13 human embryonic kidney 293 cell cultures, the recombinant adenoviruses were purified by  
14 two consecutive CsCl ultracentrifugation steps, dialyzed and titrated.

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
*Cell secretion of WT and mutant apoA-I forms.* To assess the secretion of WT and  
mutant apoA-I forms, HTB13 cells (SW 1783 human astrocytoma) grown to 80% confluence  
in Leibovitz's L-15 medium containing 2% heat-inactivated horse serum in 100 mm diameter  
dishes were infected with adenoviruses expressing WT and mutant apoA-I forms at a  
multiplicity of infection (moi) of 20. Twenty-four hours post-infection, the cells were washed  
twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in serum-free medium for 2 h.  
Following an additional wash with PBS, fresh serum-free medium was added, and after 24 h  
of incubation medium was collected and analyzed by SDS-PAGE for apoA-I expression.

51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
*Production and purification of WT and mutant apoA-I forms using the adenovirus system.* ApoA-I was purified from the culture medium of HTB13 cells grown in rollerbottles.  
The cells were infected with the adenoviruses expressing apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> or apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>. The medium was harvested every 24 h after infection and the protein was purified as described (29).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

**LCAT activation assay.** LCAT was purified as described (19) from the culture medium of human HTB13 cells infected with an adenovirus expressing the human LCAT cDNA (30). The reconstituted HDL (rHDL) particles used as the substrate contained cholesterol and [<sup>14</sup>C]-cholesterol ([4-<sup>14</sup>C] cholesterol, 0.04 mCi/ml, specific activity of 45 mCi/mmol; Perkin-Elmer Life Sciences, Inc.),  $\beta$ -oleoyl- $\gamma$ -palmitoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (POPC), and apoA-I and were prepared by the sodium cholate dialysis method as described previously (31). rHDL particles without <sup>14</sup>C-cholesterol containing mutant forms of apoA-I were prepared with the same procedure in order to measure their size by EM. The size of these particles was determined from the negatives of the EM image as described (32). The LCAT activity of the plasma of mice, four days after infection with adenoviruses expressing the mutant apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> alone or in combination with the human LCAT, was determined as described above, using instead of purified LCAT, plasma samples and as a substrate rHDL particles containing WT apoA-I. For mice expressing apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> 4  $\mu$ l of plasma were used, while for mice expressing the combination of the mutant apoA-I and human LCAT, 0.4  $\mu$ l of plasma were used. The enzymatic reactions were carried out as described and the apparent V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> were derived as described previously (17).

41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

**ABCA1-dependent cholesterol efflux assay.** ABCA1-dependent efflux of [<sup>14</sup>C]-cholesterol was measured using J774 macrophages in which expression of ABCA1 was induced by a cAMP analogue using WT and mutant apoA-I forms as cholesterol acceptors. The J774 mouse macrophages were grown in DMEM containing 4.5g/L glucose, 10% (v/v) FBS and antibiotics, labeled with 8  $\mu$ Ci/ml 4[<sup>14</sup>C]cholesterol for 24 h, and then treated with 0.3 mM cpt-cAMP for 24 h. Cholesterol efflux was determined as described previously (15).

55  
56  
57  
58  
59  
60

**Animal studies, plasma lipids and apoA-I.** ApoA-I<sup>-/-</sup> (ApoA-I<sup>tm1Unc</sup>) C57BL/6J mice (3) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). The mice were maintained on a 12 h light/dark cycle and standard rodent chow. All procedures performed on the mice were

1  
2  
3 in accordance with National Institutes of Health and institutional guidelines. ApoA-I<sup>-/-</sup> mice  
4  
5 6-8 weeks of age were injected via tail vein with 1-2x10<sup>9</sup> pfu of recombinant adenovirus per  
6  
7 animal and the animals were sacrificed 4 days post-injection following a 4 h fast. The  
8  
9 concentration of total cholesterol, free cholesterol, phospholipids and triglycerides of plasma  
10  
11 drawn 4 days post-infection was determined using the cholesterol E, free cholesterol C and  
12  
13 phospholipids B reagents (Wako Chemicals USA, Inc.) and INFINITY triglycerides reagent  
14  
15 (ThermoDMA), respectively, according to the manufacturer's instructions. The concentration  
16  
17 of cholesteryl esters was determined by subtracting the concentration of free cholesterol from  
18  
19 the concentration of total cholesterol. Plasma apoA-I levels were determined using the  
20  
21 AutoKit-AI (Wako Chemicals USA, Inc.). For FPLC analysis of plasma, 17 μl plasma  
22  
23 obtained from mice infected with adenovirus-expressing WT or mutant apoA-I forms were  
24  
25 loaded onto a Sepharose 6 PC column in a SMART microFPLC system (Amersham  
26  
27 Biosciences) and eluted with PBS. A total of 25 fractions of 50 μl volume each were  
28  
29 collected for further analysis. The concentration of lipids in the FPLC fractions was  
30  
31 determined as described above.

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39 ***Fractionation of plasma by density gradient ultracentrifugation and electron***  
40  
41 ***microscopy (EM) analysis of the apoA-I containing fractions.*** For this analysis, 300 μl of  
42  
43 plasma obtained from adenovirus-infected mice was fractionated by density gradient  
44  
45 ultracentrifugation as described (17). Aliquots of 100 μL from each fraction were subjected to  
46  
47 SDS-PAGE and the protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue.  
48  
49 For EM analysis, the fractions that float in the HDL region were treated and photographed as  
50  
51 described (17).  
52  
53  
54  
55

56  
57 ***Non-denaturing two-dimensional (2D) gel electrophoresis.*** The distribution of HDL  
58  
59 subfractions in plasma was analyzed by 2D electrophoresis as described (17). The proteins  
60  
were transferred to a nitrocellulose membrane and apoA-I was detected by using the goat



1  
2  
3 polyclonal anti-human apoA-I antibody AB740 (Chemicon International).  
4

5 ***RNA isolation and hybridization analysis.*** Total RNA was isolated from liver tissue of  
6 mice 4 days post-infection, using Tizol® (Invitrogen) according to the manufacturer's  
7 instructions. The RNA was analyzed by Northern blotting and the apoA-I and GAPDH  
8 mRNA bands were detected and quantitated as described (19).  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

## 17 **Results**

18 ***Protein expression and ability of mutant apoA-I forms to activate LCAT and promote***  
19 ***ABCA1 mediated cholesterol efflux in vitro.*** We have generated recombinant adenoviruses  
20 expressing the WT apoA-I and the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>Fin</sub>  
21 mutants that were found in human patients (13;22;24-27). To assess the expression and  
22 secretion of the two mutants compared to WT apoA-I, we infected HTB13 cells grown in 5  
23 ml medium in 100 mm diameter dishes with recombinant adenoviruses harboring the WT or  
24 the mutant apoA-I genes using an moi of 20. Analysis of the cultured media 24 h post-  
25 infection showed that the WT apoA-I, apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>Fin</sub>  
26 were secreted at a rate of 173 , 139 and 159 µg/ml/24 hrs, respectively, indicating that the  
27 secretion of the WT and the two mutants was comparable (Fig. 1A). For the LCAT  
28 activation, WT and the two mutant forms of apoA-I produced by the adenovirus expression  
29 system were purified and used for generation of rHDL particles as described (18;19). The  
30 size of the rHDL particles was determined from the negatives of the EM images. The  
31 particles have a diameter of  $13.7 \pm 3.9$ nm and thickness of 5.4nm. The molar ratio of  
32 POPC:cholesterol:apoA-I of the discoidal particles is 60:8:1, respectively. LCAT activity was  
33 assayed as the rate of production of labeled cholesteryl esters from the <sup>14</sup>C-labeled rHDL  
34 particles. The esterification of the cholesterol of the rHDL particles containing the apoA-  
35 I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>Fin</sub> mutants was very low and could be overcome  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

by excess LCAT. It was found that a 20-fold increase in enzyme concentration resulted in an initial velocity of esterification comparable to that obtained with normal apoA-I using 1-fold enzyme concentration. Using this enzyme concentration, the  $K_{m_{app}}$  and  $V_{max_{app}}$  values of the mutants were calculated and compared to those of the WT apoA-I and are shown in Fig. 1B. Compared to WT, mutant apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> had greatly reduced  $V_{max_{app}}$  values and normal  $K_{m_{app}}$  values, whereas mutant apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> had greatly reduced  $V_{max_{app}}$  and 3.5-fold increase in  $K_{m_{app}}$  (Fig. 1B). These findings are compatible with previously published data (13;23;33). The ability of apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> to promote ABCA1-mediated cholesterol efflux was determined using J774 mouse macrophages that were stimulated by the cAMP analogue, cpt-cAMP. The net cpt-cAMP-dependent cholesterol efflux from J774 macrophages using the mutant proteins as cholesterol acceptors was obtained by subtracting the efflux values of the untreated cells from the efflux values of the cpt-cAMP-treated cells after 4 h incubation. The efflux values obtained for WT apoA-I were set to 100%. This analysis showed that the cpt-cAMP-dependent (ABCA1-mediated) cholesterol efflux in the presence of apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> acceptor was 86% and in the presence of apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> acceptor was 113% of the WT control (Fig. 1C). Previous studies indicated that the capacity of apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> to promote cholesterol efflux from J774 macrophages was similar to that of WT apoA-I (33).

***Plasma lipid, apoA-I and hepatic apoA-I mRNA levels following adenovirus infection:***

Mice were injected with doses ranging from 1-2 x 10<sup>9</sup> pfu in order to achieve hepatic mRNA levels that were comparable to the WT apoA-I mRNA expression levels. The different doses of the mutant forms were used to look for potential changes in the observed phenotypes as a result of increase or decreased apoA-I gene expression. Potential liver damage following adenovirus infection was assessed by measuring serum transaminases using Reflotron Plus system (Roche). These analyses showed normal serum transaminase levels when mice were

1  
2  
3 infected with  $2 \times 10^9$  pfu recombinant adenoviruses. Analysis of plasma lipids and apoA-I  
4 levels 4 days post-infection showed that compared to WT apoA-I, mice expressing the two  
5 mutants had greatly reduced plasma cholesterol levels and reduced plasma CE/TC ratio.  
6  
7 Plasma triglycerides and phospholipid levels of mice expressing the two mutants were also  
8 reduced compared to mice expressing the WT apoA-I (Table 2). Treatment of apoA-I<sup>-/-</sup> mice  
9  
10 with a control adenovirus expressing the green fluorescent protein (GFP) did not change their  
11 plasma lipid levels compared to untreated apoA-I<sup>-/-</sup> mice. FPLC analysis of plasma showed  
12 that the HDL cholesterol peak of the mice expressing the two mutants was very small  
13 compared to WT apoA-I (Fig. 2) while the apoA-I mRNA levels of the two mutants were  
14 comparable or even higher to those of WT apoA-I indicating defective synthesis of HDL  
15 (Table 2).  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 Analysis of the distribution of apoA-I following density gradient ultracentrifugation of  
30 plasma showed that in mice infected with adenoviruses expressing the WT apoA-I, apoA-I  
31 protein was predominantly distributed in the HDL2 and HDL3 region (Fig. 3A). Consistent  
32 with the FPLC data shown in Fig. 2, in mice infected with  $1 \times 10^9$  pfu of the adenoviruses  
33 expressing the mutant apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>, traces of apoA-I protein were detected in the  
34 HDL3 region and the  $d > 1.21$  g/ml fraction (Fig. 3B). Similar distribution of apoA-I was  
35 obtained when mice were infected with  $2 \times 10^9$  pfu of adenoviruses expressing the apoA-  
36 I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> mutant (data not shown). In mice infected with the adenoviruses expressing  
37 the apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> mutant, small amounts of apoA-I were distributed in HDL2 and  
38 HDL3 as well as the LDL region and the  $d > 1.21$  g/ml fraction (Fig. 3C). To observe  
39 detectable apoA-I and lipid levels, it was necessary to use a higher dose ( $2 \times 10^9$  pfu) of the  
40 adenovirus expressing this mutant. EM analysis of the HDL fractions 6-8 obtained by density  
41 gradient ultracentrifugation (Fig. 3A-C) showed that WT apoA-I promoted the formation of  
42 spherical particles (Fig. 3D), whereas apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 mutants contained very small number of particles (Fig. 3E, F). The number of particles  
4  
5 generated by the two mutants was similar to that obtained in apoA-I<sup>-/-</sup> mice or in mice  
6  
7 infected with the control adenovirus expressing GFP (Fig. 3G). 2D gel electrophoresis of  
8  
9 plasma showed that the WT apoA-I formed  $\alpha$ -HDL particles and small amounts of pre $\beta$ <sub>1</sub>-  
10  
11 HDL particles. The  $\alpha$ HDL to pre $\beta$  ratio in plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing WT apoA-I or  
12  
13 the mutants apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> or apoA-I(Leu159Arg)<sub>Fin</sub> were estimated by scanning  
14  
15 densitometry. The ratio was approximately 13 in the case of WT apoA-I (Fig. 3H). In the  
16  
17 case of the two mutants the  $\alpha$ 4-HDL/pre $\beta$  ratio of apoA-I (Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and  
18  
19 (Leu159Arg)<sub>Fin</sub> was approximately 3.7 and 2.1, respectively (Fig. 3I,J). In both cases of the  
20  
21 mutant apoA-I forms,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3 HDL subpopulations were not formed. Similar profile of  
22  
23 HDL subfractions was obtained when mice were infected with  $2 \times 10^9$  pfu of adenoviruses  
24  
25 expressing the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> mutant (data not shown).  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 ***In vivo effect of the LCAT on plasma lipids, FPLC profiles, the distribution of HDL in***  
33 ***different densities, the size and shape of HDL.*** To assess how apoA-I mutations affect the  
34  
35 biogenesis of HDL, apoA-I<sup>-/-</sup> mice were co-infected with a mixture of adenoviruses  
36  
37 expressing apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> mutants along with human  
38  
39 LCAT. The relative levels of expression of the two mutants as determined by apoA-I mRNA  
40  
41 following co-infection, were comparable to or lower than the mRNA levels of mice infected  
42  
43 with WT or mutant apoA-I forms alone (Table 2). The co-infection of LCAT, with either of  
44  
45 the two mutants, had a dramatic effect on plasma lipids and lipoprotein levels. The LCAT  
46  
47 activity of the plasma of mice, four days after infection with adenoviruses expressing either  
48  
49 the mutant apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> alone or in combination with the human LCAT, was  
50  
51 determined using as a substrate rHDL particles containing WT apoA-I. The LCAT catalytic  
52  
53 efficiency of the plasma expressed as the ratio of  $V_{max,app}/K_{m,app}$  was 2.1 nmole(CE)/h/ $\mu$ M  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 apoA-I for mice expressing the mutant apoA-I form alone and 89 nmole(CE)/h/ $\mu$ M apoA-I  
4  
5  
6 for mice expressing the mutant apoA-I form in combination with human LCAT.  
7

8 The mass of LCAT in plasma was estimated by Western blotting using mouse-LCAT  
9  
10 antibodies that cross-react efficiently with human LCAT. It was found that in apoA-I<sup>-/-</sup> mice  
11  
12 expressing the control protein GPF, the plasma LCAT was undetectable, but expression of  
13  
14 WT apoA-I increases greatly the mouse LCAT in the plasma. In apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the  
15  
16 mutant apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> the mouse LCAT was also decreased dramatically. The levels  
17  
18 of LCAT in plasma were restored to normal levels (those observed in the presence of WT  
19  
20 apoA-I) by infection of mice with adenoviruses expressing the mutant form of apoA-I in  
21  
22 combination with human LCAT (Figure 4C). In mice co-infected with adenoviruses  
23  
24 expressing LCAT and the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> mutant there was a 13-, 8- and 12.5-fold  
25  
26 increase in the plasma apoA-I, total and the esterified cholesterol, respectively. The LCAT  
27  
28 treatment also normalized the CE/TC ratio of total plasma and of the HDL fraction (Table 2,  
29  
30 Fig. 4A, respectively). All the increase in cholesterol could be attributed to the increase in  
31  
32 plasma HDL (Fig. 4A). The LCAT co-infection also increased approximately 4-fold the  
33  
34 plasma free cholesterol and triglycerides levels (Table 2). In mice co-infected with  
35  
36 adenoviruses expressing LCAT and the apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> mutant there was a 7.6-, 14-  
37  
38 and 81-fold increase at the plasma apoA-I, the total and the esterified cholesterol levels,  
39  
40 respectively. The CE/TC ratio of total plasma and of the HDL fraction were normalized  
41  
42 (Table 2, Fig. 4B, respectively). SDS-PAGE analysis of the fractions obtained by density  
43  
44 gradient ultracentrifugation showed that the plasma apoA-I for the two mutants was  
45  
46 distributed mostly in the HDL2 and HDL3 region, with small amounts in the lower density  
47  
48 fractions. The observed distribution of the mutant apoA-I forms following the LCAT  
49  
50 treatment was similar but not identical to the distribution of the WT apoA-I without LCAT  
51  
52 treatment (compare Fig. 3A with Figs 4D,E) The distribution of apoA-I assessed by  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 ultracentrifugation and SDS-PAGE was also reflected in the distribution of HDL cholesterol  
4  
5 of the two mutants relative to WT apoA-I, as determined by FPLC analysis (Fig. 4A,B).  
6  
7

8 Useful information was obtained by comparison of the relative distribution of apoA-I,  
9  
10 apoE and apoA-IV in the plasma of mice infected with adenoviruses expressing WT and  
11  
12 mutant apoA-I forms with or without concomitant infection with adenovirus expressing  
13  
14 LCAT. In mice expressing the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>, the LCAT  
15  
16 treatment increased the concentration of apoE in the HDL2 and LDL region, it also increased  
17  
18 the concentration of apoA-IV in the HDL3 region (compare Fig. 3B-C with Fig. 4D,E). The  
19  
20 LCAT treatment also promoted the formation of spherical HDL particles similar to those  
21  
22 formed by WT apoA-I (compare Fig. 3D with Figs. 4F,H). It also normalized the pre $\beta$ 1- to  $\alpha$ -  
23  
24 HDL ratio of plasma HDL (compare Figs. 3I,J with Figs. 4G,I). In mice expressing the apoA-  
25  
26 I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> we observed formation of pre $\beta$ 1 along with  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 2 and to a lesser extend  
27  
28  $\alpha$ 1 particles (Fig. 4G). In mice expressing the apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> we observed pre $\beta$ 1  
29  
30 along with  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 1 particles (Fig. 4I).  
31  
32  
33  
34  
35

36  
37 Figure5 is a schematic representation showing the pathway of biogenesis of HDL and  
38  
39 how the two mutations affect the esterification of the cholesterol of the pre $\beta$  HDL particles, a  
40  
41 process that is important for their conversion to discoidal and spherical HDL particles. The  
42  
43 figure also shows that if esterification of cholesterol is prevented pre $\beta$ -HDL particles are  
44  
45 removed from plasma thus resulting in low HDL and apoA-I levels.  
46  
47  
48  
49

## 50 51 **Discussion**

52  
53 In previous studies we considered the HDL biogenesis as a continuous pathway where  
54  
55 apoA-I and various participating proteins interact successively to form initially pre $\beta$ -HDL  
56  
57 and subsequently discoidal and spherical HDL particles that are biologically active (5). The  
58  
59 strategy we employed in these studies was adenovirus-mediated gene transfer of apoA-I  
60

1  
2  
3 mutants to apoA-I<sup>-/-</sup> mice and it was designed to identify steps in this pathway where  
4 intermediates cannot be converted to products and therefore accumulate in plasma (15;17-  
5 19;34) or may be degraded. Discrete phenotypes were thus observed, characterized by  
6 defective HDL synthesis due to defective ABCA1/apoA-I interactions, abnormal pre $\beta$ -/ $\alpha$ -  
7 HDL ratio, accumulation of discoidal particles (15-18;34) and various forms of dyslipidemias  
8 (15;17-19;34).

9  
10 In the present study we used a similar approach to assess the impact of two naturally  
11 occurring apoA-I mutants (apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>) on the  
12 biogenesis of HDL. The phenotypes produced in this study by adenovirus-mediated gene  
13 transfer of the two apoA-I mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice were expected to mimic phenotypes  
14 previously observed in human patients hemizygotes or heterozygotes for these mutations  
15 (13;22-26). The formation of HDL was assessed by FPLC fractionation, 2D gel  
16 electrophoresis of plasma, EM analysis and CE/TC ratio of the HDL fraction. Other  
17 parameters that indicated potential abnormalities in HDL synthesis included skewed  
18 distribution of apoA-I towards the HDL3 region.

19  
20 Our studies showed that gene transfer of apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)  
21 <sub>FIN</sub> mutants in apoA-I deficient mice resulted in very low total apoA-I and HDL cholesterol,  
22 formation of pre $\beta$ -HDL and  $\alpha$ 4-HDL particles of fast electrophoretic mobility, very small  
23 number of spherical HDL particles, as determined by EM, and decreased CE/TC ratio of  
24 plasma and the HDL fraction. Previous studies with human subjects showed that hemizygotes  
25 (compound heterozygotes for an apoA-I null allele and an apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> allele) had  
26 greatly decreased plasma apoA-I levels and near absence of HDL cholesterol whereas  
27 heterozygotes for apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> had approximately half-normal values for HDL  
28 cholesterol and plasma apoA-I (22;25). Plasma from hemizygotes contained pre $\beta$ 1-HDL and  
29 low concentration of small particles with alpha electrophoretic mobility (23). Three male  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 hemizygote patients and one heterozygote patient developed coronary stenosis (22).  
4

5 The findings of low plasma and HDL cholesterol levels in mice expressing for apoA-  
6 I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and the preponderance of pre $\beta$ - and fast migrating  $\alpha$ 4-HDL particles are in  
7 agreement with previous studies (22;23;25) and indicate that adenovirus-mediated gene  
8 transfer represents an efficient way to reproduce abnormal phenotypes that result from  
9 mutations in apoA-I. The apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> phenotype observed in our studies has  
10 identical characteristics to that of apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub>.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

19 Previous studies showed that heterozygotes for apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> mutation or mice  
20 infected with adenovirus expressing apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> had greatly reduced plasma levels  
21 of HDL cholesterol and apoA-I (24), that was mainly distributed in the HDL3 (13). They also  
22 had small size (8-9 nm) HDL particles and decreased plasma and HDL cholesteryl ester  
23 levels (13;33). Native PAGE of plasma from mice infected with adenoviruses expressing the  
24 apoA-I(Leu159 Arg)<sub>FIN</sub> mutant indicated that the HDL consisted of particles with pre $\beta$ -  
25 electrophoretic mobility as well as particles with electrophoretic mobility between  $\alpha$ - and  
26 pre $\beta$  (33). These particles were not analyzed by 2D electrophoresis but their migration is  
27 compatible with the  $\alpha$ 4-HDL particles observed in our study. Human HDL containing apoA-  
28 I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> had increased fractional catabolic rate compared to normal HDL, indicating  
29 increased catabolism of the mutant apoA-I protein (13;24). Only one affected patient with  
30 this mutation had clinically manifested atherosclerosis (13).  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 ***LCAT treatment can correct the HDL abnormalities brought about by the mutations***  
49 ***apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> and suggest a mechanism responsible***  
50 ***for the HDL deficiency observed in human patients carrying these mutations.*** Insights into  
51 the molecular etiology of the low HDL levels observed in patients with apoA-I(Leu141Arg)  
52 <sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> were provided by treatment of apoA-I<sup>-/-</sup> mice with a  
53 combination of adenoviruses expressing either of the two mutants and human LCAT. This  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 treatment corrected the plasma apoA-I and HDL levels, normalized the CE/TC ratio, restored  
4  
5 normal pre $\beta$ - and  $\alpha$ - HDL subpopulations and led to the formation of spherical HDL particles.  
6  
7

8 The restoration of normal levels of apoA-I and HDL following treatment with LCAT  
9  
10 supports the notion that apoA-I mutants are secreted efficiently by the liver but the ability of  
11  
12 the endogenous LCAT to esterify the cholesterol of the newly formed pre $\beta$ -particles is rate-  
13  
14 limiting. The *in vivo* data are also supported by cell culture studies and *in vitro* functional  
15  
16 assays of apoA-I. Thus the present as well as a previous study (33) indicated that both mutant  
17  
18 proteins could be secreted efficiently from cell cultures and they had normal ability to  
19  
20 promote ABCA1-dependent cholesterol efflux from J774 macrophages, stimulated with a  
21  
22 cAMP analog, but had reduced ability to activate LCAT *in vitro* (13;33).  
23  
24  
25  
26

27 Previous studies showed that pre $\beta$ -HDL is an efficient substrate of LCAT (35). Due to the  
28  
29 LCAT insufficiency it appears that the nascent lipidated apoA-I that is produced by  
30  
31 functional interactions of apoA-I with ABCA1, is removed fast from the plasma  
32  
33 compartment. This interpretation is supported by the increased catabolic rate of HDL  
34  
35 containing apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> (13) and the accumulation of proapoA-I in the plasma of  
36  
37 hemizygotes for apoA-I(L141R)<sub>Pisa</sub> (22). Accumulation of proapoA-I has been previously  
38  
39 observed in patients with Tangier disease (36) that are characterized by increase catabolic rate  
40  
41 of HDL (2). Increase degradation of pre $\beta$ -HDL has been observed in mice with liver specific  
42  
43 inactivation of ABCA1 (37;38). It has been shown previously that cubulin, a 600 KDa  
44  
45 membrane protein, binds both apoA-I and HDL and promotes their catabolism by the kidney  
46  
47 (39;40). Analysis of the relative abundance of endogenous LCAT in apoA-I<sup>-/-</sup> mice  
48  
49 expressing the mutant apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> showed that it was also decreased dramatically  
50  
51 compared to mice expressing WT apoA-I but was restored to normal levels (those observed  
52  
53 in the presence of WT apoA-I) by infection of mice with adenoviruses expressing the mutant  
54  
55 form of apoA-I in combination with human LCAT. The depletion of the endogenous LCAT  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 in mice expressing the mutant forms of apoA-I could be the result of rapid degradation of  
4  
5  
6 endogenous mouse LCAT bound to minimally lipidated apoA-I mutants.  
7

8 In the presence of excess LCAT the esterification of the cholesterol of the newly formed  
9  
10 pre $\beta$ -particles appears to prevent their fast catabolism and allows them to proceed in the  
11  
12 formation of discoidal and spherical HDL. We have previously shown that a substitution of  
13  
14 Arg160Ala/His162Val of apoA-I prevented the esterification of the cholesterol of the  
15  
16 discoidal HDL and resulted in the accumulation discoidal HDL in plasma (17). Thus, in this  
17  
18 case the metabolic block was the conversion of the discoidal to spherical HDL. The present  
19  
20 study establishes for the first time that the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub>  
21  
22 mutations inhibit an earlier step in the biogenesis of HDL that precedes the formation of  
23  
24 discoidal HDL particles (Fig. 5).  
25  
26  
27  
28

29 Taken together with previous studies our data suggest that following the initial lipidation  
30  
31 of apoA-I, LCAT fails to esterify the cholesterol of pre $\beta$  particles (Figs. 1B, 3A-J)  
32  
33 (13;22;24;25;33). This leads to fast removal of pre $\beta$ -HDL from plasma and a decrease in the  
34  
35 plasma HDL levels (15; 21-23; 30). The correction of the aberrant HDL phenotypes by  
36  
37 treatment with LCAT suggests a potential therapeutic intervention for HDL abnormalities  
38  
39 that result from specific mutations in apoA-I.  
40  
41  
42

43 **Acknowledgments:** We thank Dr. Silvia Santamarina-Fojo for providing the adenovirus  
44  
45 expressing the human LCAT. We thank Dr. John Parks for providing the mouse LCAT and  
46  
47 human LCAT antibodies. We thank Anne Plunkett for preparing the manuscript and Gayle  
48  
49 Forbes for technical assistance.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

1. Karathanasis, S. K., Zannis, V. I., and Breslow, J. L. (1983) Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 6147-6151.
2. Assmann, G., von Eckardstein, A., and Brewer, H. B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., Eds.) pp 2937-2960, McGraw-Hill, New York.
3. 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.
4. Matsunaga, T., Hiasa, Y., Yanagi, H., Maeda, T., Hattori, N., Yamakawa, K., Yamanouchi, Y., Tanaka, I., Obara, T., and Hamaguchi, H. (1991) Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2793-2797.
5. Zannis, V. I., Chroni, A., and Krieger, M. (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J. Mol. Med.* 84, 276-294.
6. Krieger, M. (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest* 108, 793-797.
7. Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A. R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 9774-9779.
8. Jiang, X. C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O. L., and Tall, A. R. (1999) Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J. Clin. Invest* 103, 907-914.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
9. Chajek, T. and Fielding, C. J. (1978) Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 3445-3449.
10. Miller, M., Aiello, D., Pritchard, H., Friel, G., and Zeller, K. (1998) Apolipoprotein A-I(Zavalla) (Leu159-->Pro): HDL cholesterol deficiency in a kindred associated with premature coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1242-1247.
11. Hovingh, G. K., Brownlie, A., Bisioendial, R. J., Dube, M. P., Levels, J. H., Petersen, W., Dullaart, R. P., Stroes, E. S., Zwinderman, A. H., de Groot, E., Hayden, M. R., Kuivenhoven, J. A., and Kastelein, J. J. (2004) A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1429-1435.
12. Sorci-Thomas, M. G. and Thomas, M. J. (2002) The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 121-128.
13. Miettinen, H. E., Jauhiainen, M., Gylling, H., Ehnholm, S., Palomaki, A., Miettinen, T. A., and Kontula, K. (1997) Apolipoprotein A-IFIN (Leu159-->Arg) mutation affects lecithin cholesterol acyltransferase activation and subclass distribution of HDL but not cholesterol efflux from fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 3021-3032.
14. Huang, W., Sasaki, J., Matsunaga, A., Nanimatsu, H., Moriyama, K., Han, H., Kugi, M., Koga, T., Yamaguchi, K., and Arakawa, K. (1998) A novel homozygous missense mutation in the apo A-I gene with apo A-I deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 389-396.
15. Chroni, A., Liu, T., Gorshkova, I., Kan, H. Y., Uehara, Y., von Eckardstein, A., and Zannis, V. I. (2003) The central helices of apoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the

- 1  
2  
3 wild-type apoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein  
4 formation in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 6719-6730.  
5  
6  
7  
8 16. Zannis, V. I., Chroni, A., Kypreos, K. E., Kan, H. Y., Cesar, T. B., Zanni, E. E., and  
9 Kardassis, D. (2004) Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism  
10 using adenovirus-mediated gene transfer. *Curr Opin Lipidol.* 15, 151-166.  
11  
12  
13 17. Chroni, A., Duka, A., Kan, H. Y., Liu, T., and Zannis, V. I. (2005) Point mutations in  
14 apolipoprotein a-I mimic the phenotype observed in patients with classical  
15 lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Biochemistry* 44, 14353-14366.  
16  
17  
18 18. Chroni, A., Kan, H. Y., Shkodrani, A., Liu, T., and Zannis, V. I. (2005) Deletions of  
19 Helices 2 and 3 of Human ApoA-I Are Associated with Severe Dyslipidemia  
20 following Adenovirus-Mediated Gene Transfer in ApoA-I-Deficient Mice.  
21 *Biochemistry* 44, 4108-4117.  
22  
23  
24 19. Chroni, A., Kan, H. Y., Kypreos, K. E., Gorshkova, I. N., Shkodrani, A., and Zannis,  
25 V. I. (2004) Substitutions of glutamate 110 and 111 in the middle helix 4 of human  
26 apolipoprotein A-I (apoA-I) by alanine affect the structure and in vitro functions of  
27 apoA-I and induce severe hypertriglyceridemia in apoA-I-deficient mice.  
28 *Biochemistry* 43, 10442-10457.  
29  
30  
31 20. Yamakawa-Kobayashi, K., Yanagi, H., Fukayama, H., Hirano, C., Shimakura, Y.,  
32 Yamamoto, N., Arinami, T., Tsuchiya, S., and Hamaguchi, H. (1999) Frequent  
33 occurrence of hypoalphalipoproteinemia due to mutant apolipoprotein A-I gene in the  
34 population: a population-based survey. *Hum. Mol. Genet.* 8, 331-336.  
35  
36  
37 21. Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M., and Murthy, H.  
38 M. (2006) Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective  
39 effect against cardiovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 2126-2131.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
22. Miccoli, R., Bertolotto, A., Navalesi, R., Odoguardi, L., Boni, A., Wessling, J., Funke, H., Wiebusch, H., Eckardstein, A., and Assmann, G. (1996) Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I(L141R)Pisa, and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications, and coronary heart disease. *Circulation* 94, 1622-1628.
23. Miccoli, R., Zhu, Y., Daum, U., Wessling, J., Huang, Y., Navalesi, R., Assmann, G., and von Eckardstein, A. (1997) A natural apolipoprotein A-I variant, apoA-I (L141R)Pisa, interferes with the formation of alpha-high density lipoproteins (HDL) but not with the formation of pre beta 1-HDL and influences efflux of cholesterol into plasma. *Journal of Lipid Research* 38, 1242.
24. Miettinen, H. E., Gylling, H., Miettinen, T. A., Viikari, J., Paulin, L., and Kontula, K. (1997) Apolipoprotein A-IFin. Dominantly inherited hypoalphalipoproteinemia due to a single base substitution in the apolipoprotein A-I gene. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 83-90.
25. Pisciotta, L., Miccoli, R., Cantafora, A., Calabresi, L., Tarugi, P., Alessandrini, P., Bittolo, B. G., Franceschini, G., Cortese, C., Calandra, S., and Bertolini, S. (2003) Recurrent mutations of the apolipoprotein A-I gene in three kindreds with severe HDL deficiency. *Atherosclerosis* 167, 335-345.
26. Navalesi, R., Miccoli, R., Odoguardi, L., Funke, H., von Eckardstein, A., Wiebusch, H., and Assmann, G. (1995) Genetically determined absence of HDL-cholesterol and coronary atherosclerosis. *Lancet* 346, 708-709.
27. Gylling, H., Relas, H., Miettinen, H. E., Radhakrishnan, R., and Miettinen, T. A. (1996) Delayed postprandial retinyl palmitate and squalene removal in a patient heterozygous for apolipoprotein A-IFIN mutation (Leu 159-->Arg) and low HDL cholesterol level without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 127, 239-243.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
28. Roghani, A. and Zannis, V. I. (1988) Alterations of the glutamine residues of human apolipoprotein AI propeptide by in vitro mutagenesis. Characterization of the normal and mutant protein forms. *Biochemistry* 27, 7428-7435.
  29. Laccotripe, M., Makrides, S. C., Jonas, A., and Zannis, V. I. (1997) The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 272, 17511-17522.
  30. Amar, M. J. A., Shamburek, R. D., Foger, B., Hoyt, R. F., Wood, D. O., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B. (1998) Adenovirus-mediated expression of LCAT in non-human primates leads to an antiatherogenic lipoprotein profile with increased HDL and decreased LDL. *Circulation* 98, 35.
  31. Matz, C. E. and Jonas, A. (1982) Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J. Biol. Chem.* 257, 4535-4540.
  32. Kypreos, K. E. and Zannis, V. I. (2007) Pathway of biogenesis of apolipoprotein E-containing HDL in vivo with the participation of ABCA1 and LCAT. *Biochem. J.* 403, 359-367.
  33. McManus, D. C., Scott, B. R., Franklin, V., Sparks, D. L., and Marcel, Y. L. (2001) Proteolytic degradation and impaired secretion of an apolipoprotein A-I mutant associated with dominantly inherited hypoalphalipoproteinemia. *J. Biol. Chem.* 276, 21292-21302.
  34. Reardon, C. A., Kan, H. Y., Cabana, V., Blachowicz, L., Lukens, J. R., Wu, Q., Liadaki, K., Getz, G. S., and Zannis, V. I. (2001) In vivo studies of HDL assembly and metabolism using adenovirus-mediated transfer of ApoA-I mutants in ApoA-I-deficient mice. *Biochemistry* 40, 13670-13680.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
35. Nakamura, Y., Kotite, L., Gan, Y., Spencer, T. A., Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (2004) Molecular mechanism of reverse cholesterol transport: reaction of pre-beta-migrating high-density lipoprotein with plasma lecithin/cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 43, 14811-14820.
36. Zannis, V. I., Lees, A. M., Lees, R. S., and Breslow, J. L. (1982) Abnormal apoprotein A-I isoprotein composition in patients with Tangier disease. *J. Biol. Chem.* 257, 4978-4986.
37. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., and Parks, J. S. (2005) Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Invest* 115, 1333-1342.
38. Singaraja, R. R., Stahmer, B., Brundert, M., Merkel, M., Heeren, J., Bissada, N., Kang, M., Timmins, J. M., Ramakrishnan, R., Parks, J. S., Hayden, M. R., and Rinninger, F. (2006) Hepatic ATP-binding cassette transporter A1 is a key molecule in high-density lipoprotein cholesteryl ester metabolism in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1821-1827.
39. Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E. I., Aminoff, M., de la, C. A., Krahe, R., Verroust, P. J., and Moestrup, S. K. (1999) The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat. Med.* 5, 656-661.
40. Hammad, S. M., Stefansson, S., Twal, W. O., Drake, C. J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer, H. B., Jr., and Argraves, W. S. (1999) Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10158-10163.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TABLE 1. Oligonucleotide sequence of primers used in PCR amplifications**

Primer Name <sup>a</sup>	Primer Sequence	Nucleotide Mutation <sup>b</sup>
apoAIg F apoAIg R	5' - GCTCTAGATCTGACATAAATAGGCCCTGC - 3' 5' - GCGGATATCCAGGCCTTGTTTGAGCC - 3'	-
L141R apoAI F L141R apoAI R	5' - CTGCAAGAGAAG <b>CGG</b> <sup>c</sup> AGCCCACTGGGC - 3' 5' - GCCCAGTGGGCT CCG CTTCTCTTGCAG - 3'	T-1009-G
L159R apoAI F L159R apoAI R	5' - CATGTGGACGCG <b>CGG</b> CGCACGCATCTG - 3' 5' - CAGATGCGTGCG CCG CGCGTCCACATG - 3'	T-1063-G

<sup>a</sup> Amino acid position refers to the mature plasma apoA-I protein sequence.

<sup>b</sup> Nucleotide number of the human apoA-I genomic sequence (*I*) relative to the translation initiation ATG codon.

<sup>c</sup> Codon encoding the mutation is shown in bold.

**TABLE 2. Analysis of plasma lipids and apoA-I levels and hepatic mRNA levels of apoA-I<sup>-/-</sup> mice, 4 days post-infection with recombinant adenoviruses expressing the WT apoA-I or apoA-I mutants or the control protein GFP.**

Protein Expressed	Cholesterol (TC) (mg/dl)	Free Cholesterol (mg/dl)	Cholesterol Esters (CE) (mg/dl)	CE/TC	Triglycerides (TG)	Phospholipids (P)	Relative ApoA-I mRNA (%)	ApoA-I Protein (mg/dl)
apoA-I WT	148 ± 11	32 ± 4	116 ± 7	0.78±0.01	63 ± 1	343 ± 31	100 ± 32	186 ± 34
GFP	38 ± 0.1	18 ± 0.5	20 ± 0.3	0.53±0.01	50 ± 5	26 ± 8	-	-
apoA-I (Leu141Arg) <sub>Pisa</sub>	23 ± 0.4	11 ± 0.4	10 ± 0.8	0.44±0.03	11 ± 2.8	41 ± 1	88 ± 9	17 ± 4
apoA-I (Leu141Arg) <sub>Pisa</sub> + LCAT	184±53	59±16	125±37	0.68±0.01	41±0.3	50±22	91±2	224±7
apoA-I (Leu159Arg) <sub>FIN</sub>	16±5	14±4	2±1	0.13±0.04	25±4	19±6	216±32	25±9
apoA-I (Leu159Arg) <sub>FIN</sub> + LCAT	224±22	61±8	163±15	0.73±0.01	53±15	94±30	63±9	190±20
Untreated mice								
apoA-I <sup>-/-</sup>	28±5	5±2	23±5	0.81±0.02	27±3	7±2	-	-
C57BL/6	96±16	22±2	74±18	0.76±0.06	19±0.7	170±20	-	-

Values are means ± S.D. (n=4-6)

## Figure Legends

**Figure 1A-C. ApoA-I expression and in vitro functional assays.** *Panel A:* SDS-PAGE analysis of 100  $\mu$ L of culture medium of HTB13 cells infected with control adenovirus expressing GFP and adenoviruses expressing WT and mutant apoA-I forms. *Panel B:* Activation of LCAT by rHDL containing WT or mutant apoA-I forms. The apparent  $K_M$  and  $V_{MAX}$  values and the catalytic efficiency  $V_{MAXapp}/K_{Mapp}$  of the enzyme are shown on the bottom of the figure. Values are the means  $\pm$  S.D. from three independent experiments performed in duplicate. *Panel C:* ABCA1-mediated cholesterol efflux in the presence of WT apoA-I and apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> and apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> was determined as described in *Experimental Procedures*.

**Figure 2. FPLC profiles of total cholesterol of apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with adenoviruses expressing the WT apoA-I ( $1 \times 10^9$  pfu), apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> ( $1 \times 10^9$  pfu), apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> ( $2 \times 10^9$  pfu) or the control protein GFP ( $1 \times 10^9$  pfu).** Plasma samples were obtained 4 days post-infection.

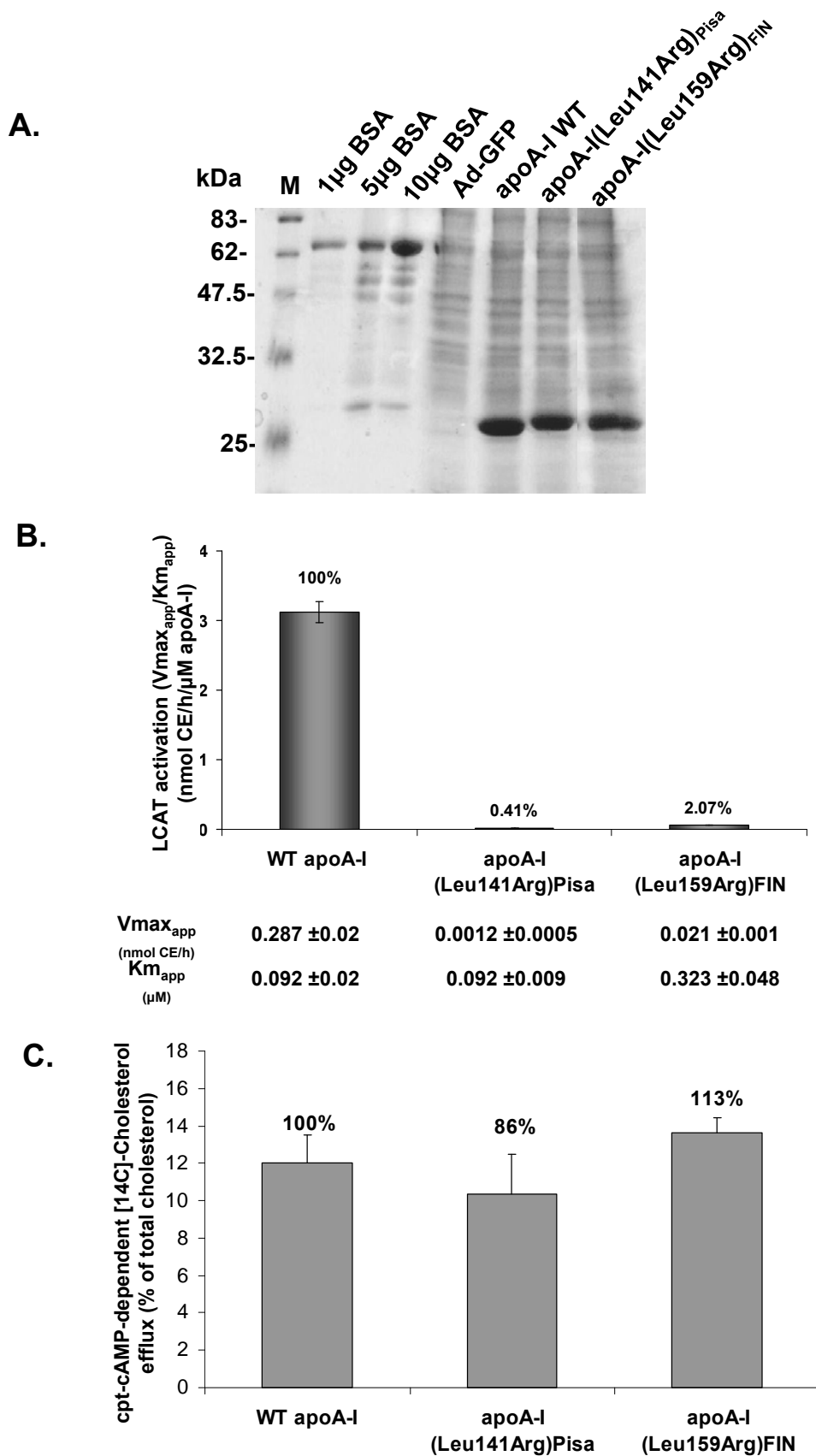
**Figure 3A-J. Analyses of plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with adenoviruses expressing the WT apoA-I (A,D,H), the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> (B,E,I), the apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> (C,F,J) or the control adenovirus expressing GFP (G) by density gradient**

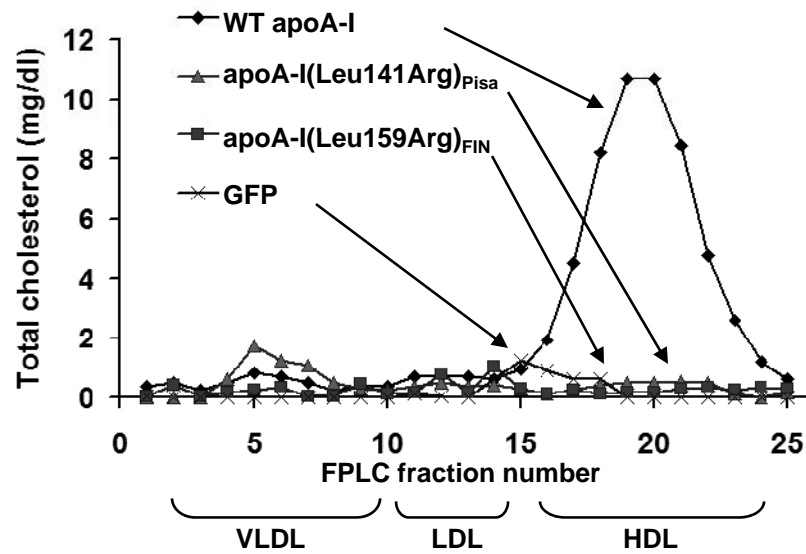
**ultracentrifugation, SDS-PAGE, EM and 2D gel electrophoresis.** *Panels A-C:* SDS-PAGE analysis of density gradient ultracentrifugation fractions. *Panels D-G:* EM pictures of HDL fractions 6-8 obtained from apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the WT apoA-I, the mutant forms or the control adenovirus expressing GFP following density gradient ultracentrifugation of plasma as indicated. The photomicrographs were taken at 75,000x magnification and enlarged 3 times. *Panels H-K:* Analysis of plasma obtained from mice expressing the WT apoA-I mutant forms as indicated following 2D gel electrophoresis and Western blotting.

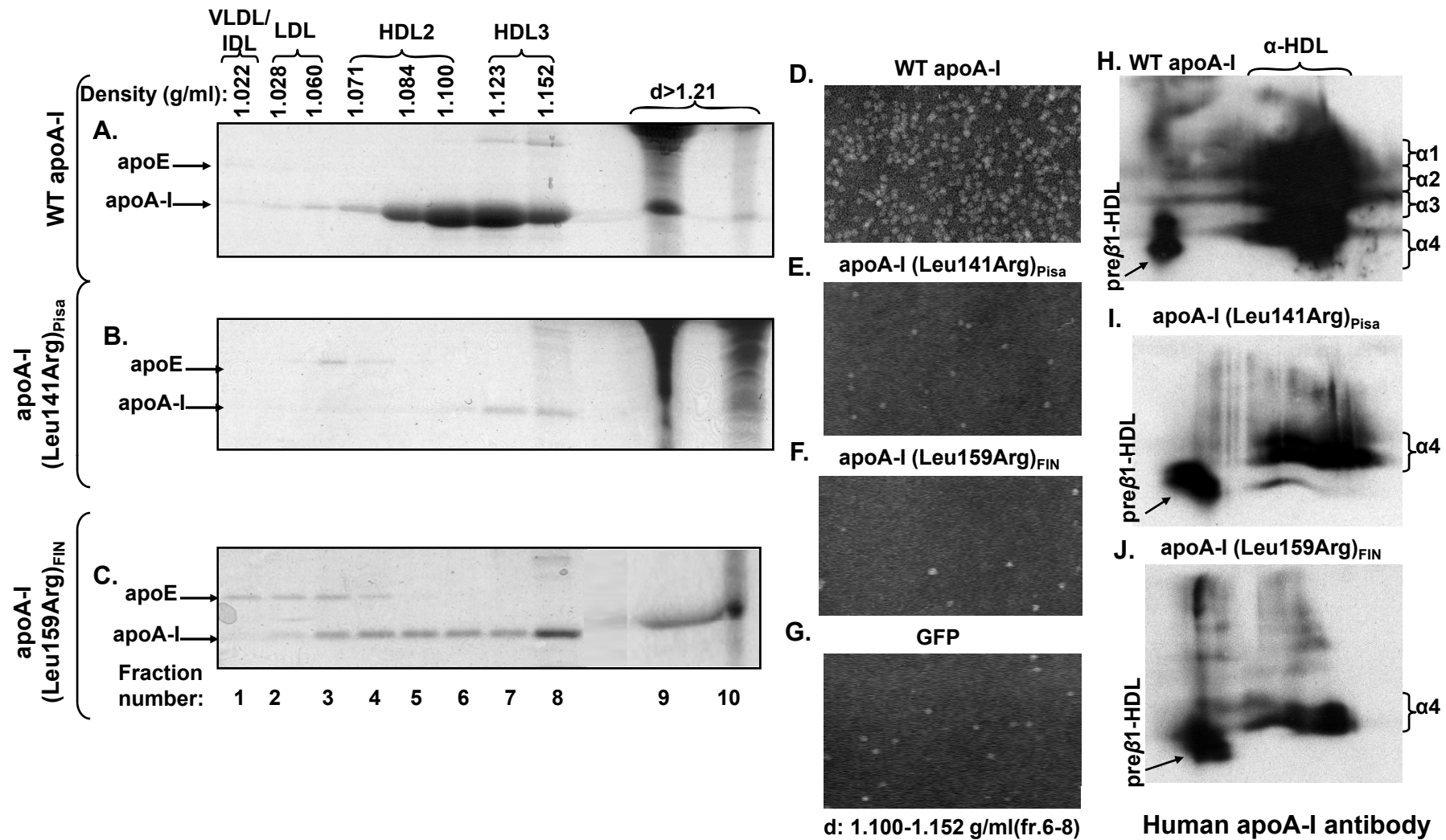
**Figure 4A-H. Analyses of plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with a combination of**

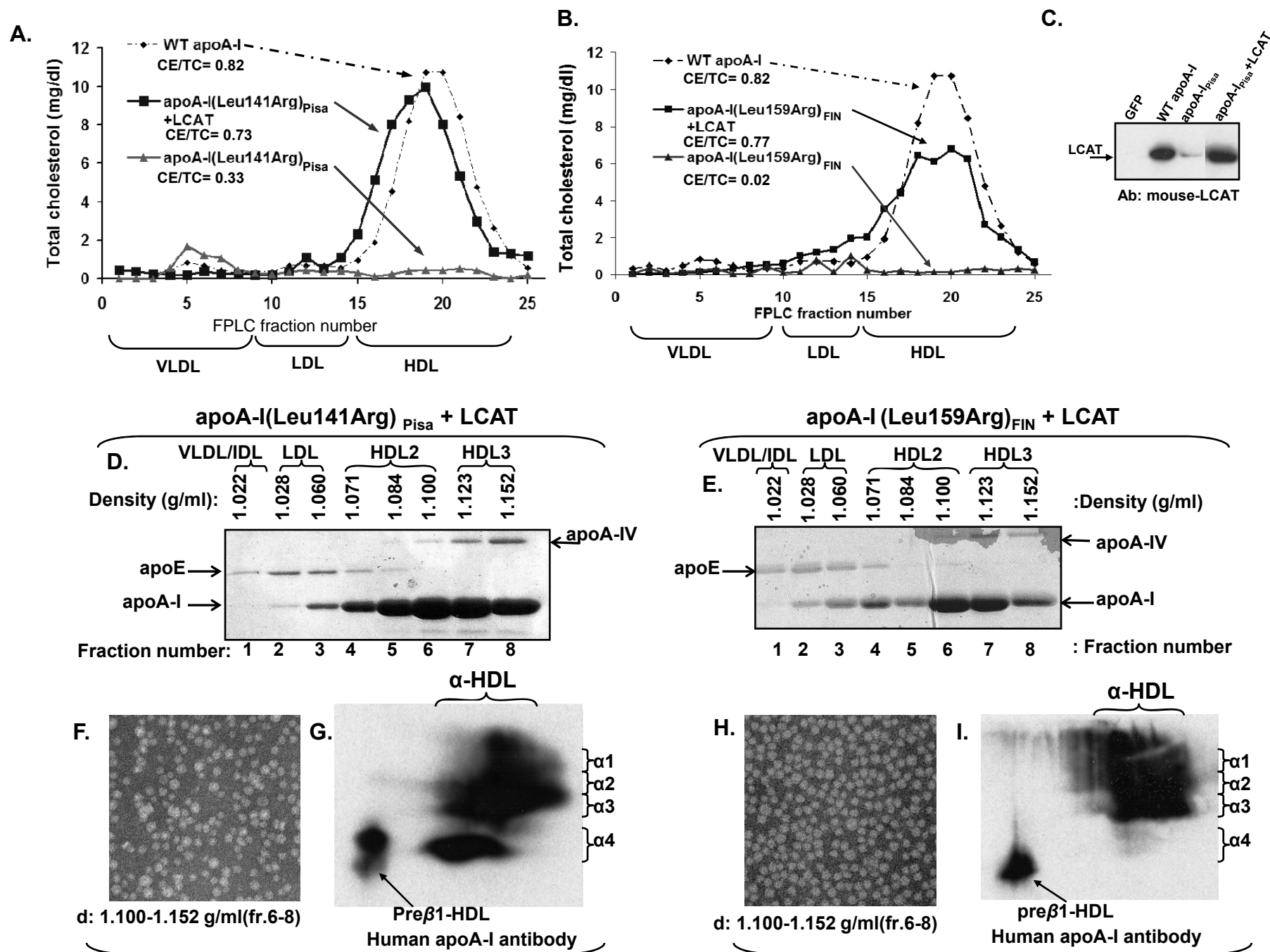
1  
2  
3 *adenoviruses expressing human LCAT (5x10<sup>8</sup> pfu) and apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> (1x10<sup>9</sup> pfu)*  
4  
5  
6 *or the apoA-I(Leu159Arg)<sub>FIN</sub> (2x10<sup>9</sup> pfu).* Panels A,B: FPLC profiles as indicated. The  
7  
8 CE/TC ratio of the HDL fractions 15-22 of the FPLC is indicated. Panel C: Western blot  
9  
10 analysis of plasma from apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with adenoviruses expressing either the  
11  
12 control protein, GFP, or the WT apoA-I or the apoA-I(Leu141Arg)<sub>Pisa</sub> alone or in  
13  
14 combination with human LCAT, as indicated at the top of the figure. An aliquot of 0.5 ml of  
15  
16 plasma was analyzed. The blot was probed with rabbit anti-mouse-LCAT antibody which  
17  
18 cross-reacts with both human and mouse LCAT. Panels D,E: SDS-PAGE profiles of  
19  
20 fractions obtained by density gradient ultracentrifugation analysis of plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice  
21  
22 expressing the mutant forms of apoA-I in combination with the human LCAT, as indicated.  
23  
24 Panels F,H: EM pictures of HDL fractions 6-8 obtained from apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the  
25  
26 indicated mutant forms in combination with human LCAT, following density gradient  
27  
28 ultracentrifugation of plasma as indicated. The photomicrographs were taken at 75,000x  
29  
30 magnification and enlarged 3 times. Panels G,I: Analysis of plasma obtained from mice  
31  
32 expressing the indicated mutant forms in combination with human LCAT following 2D gel  
33  
34 electrophoresis and Western blotting.

35  
36  
37  
38  
39  
40  
41 **Figure 5. Schematic representation showing the pathway of biogenesis of HDL and how**  
42  
43 **the two mutations affect the esterification of cholesterol of the pre $\beta$ -HDL particles and**  
44  
45 **prevent their conversion to discoidal and spherical HDL, thus promoting their catabolism.**  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

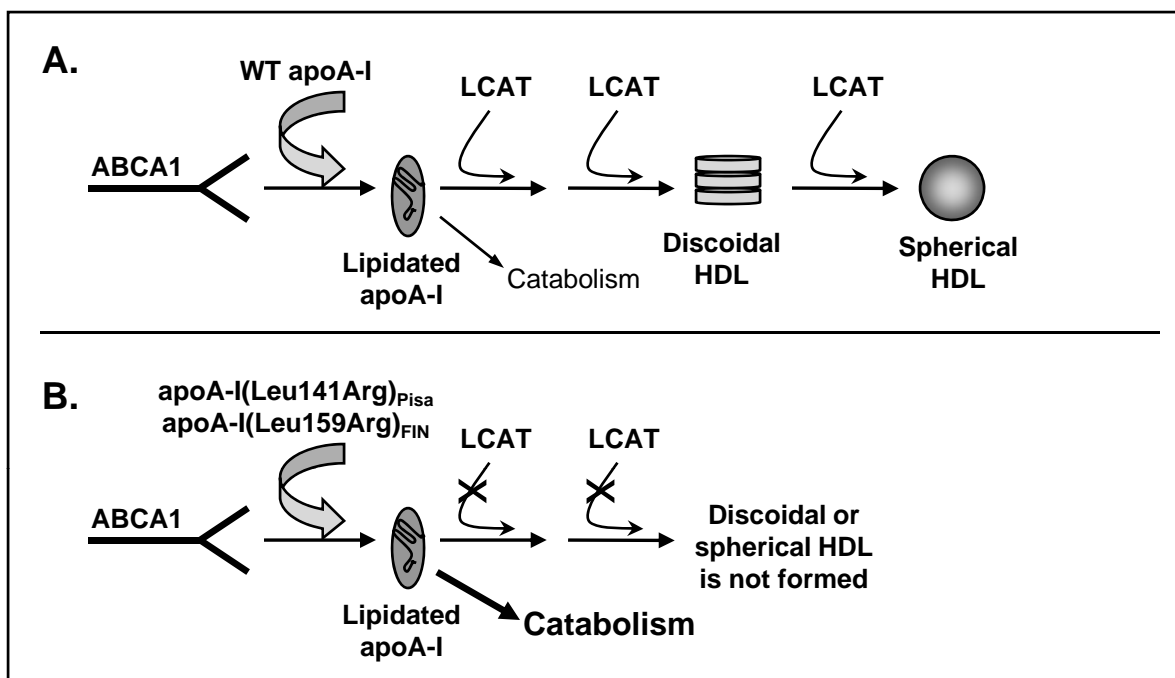


Koukos G. *et al.*, Figure 2







Koukos G. *et al.*, Figure 5

# Naturally occurring and bioengineered apoA-I mutations that inhibit the conversion of discoidal to spherical HDL: the abnormal HDL phenotypes can be corrected by treatment with LCAT

Georgios KOUKOS\*†, Angeliki CHRONI‡, Adelina DUKA\*, Dimitris KARDASSIS‡§ and Vassilis I. ZANNIS\*‡<sup>1</sup>

\*Molecular Genetics, Departmental of Medicine and Biochemistry, Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, U.S.A., †Department of Basic Sciences, University of Crete Medical School, Heraklion, GR-71110, Greece, ‡Institute of Biology, National Center for Scientific Research 'Demokritos', 15310 Agia Paraskevi, Athens, Greece, and §Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH (Foundation for Research and Technology-Hellas), Heraklion, Crete, Greece

In the present study we have used adenovirus-mediated gene transfer of apoA-I (apolipoprotein A-I) mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice to investigate how structural mutations in apoA-I affect the biogenesis and the plasma levels of HDL (high-density lipoprotein). The natural mutants apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and the bioengineered mutant apoA-I(R149A) were secreted efficiently from cells in culture. Their capacity to activate LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase) *in vitro* was greatly reduced, and their ability to promote ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)-mediated cholesterol efflux was similar to that of WT (wild-type) apoA-I. Gene transfer of the three mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice generated aberrant HDL phenotypes. The total plasma cholesterol of mice expressing the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(R149A) and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> mutants was reduced by 78, 59 and 61 % and the apoA-I levels were reduced by 68, 64 and 55 % respectively, as compared with mice expressing the WT apoA-I. The CE (cholesteryl ester)/TC (total cholesterol) ratio of HDL was decreased and the apoA-I was distributed in the HDL3 region.

apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) promoted the formation of pre $\beta$ 1 and  $\alpha$ 4-HDL subpopulations and gave a mixture of discoidal and spherical particles. apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> generated subpopulations of different sizes that migrate between pre $\beta$  and  $\alpha$ -HDL and formed mostly spherical and a few discoidal particles. Simultaneous treatment of mice with adenovirus expressing any of the three mutants and human LCAT normalized plasma apoA-I, HDL cholesterol levels and the CE/TC ratio. It also led to the formation of spherical HDL particles consisting mostly of  $\alpha$ -HDL subpopulations of larger size. The correction of the aberrant HDL phenotypes by treatment with LCAT suggests a potential therapeutic intervention for HDL abnormalities that result from specific mutations in apoA-I.

**Key words:** adenovirus, apolipoprotein A-I (apoA-I), ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), gene transfer, high-density lipoprotein (HDL) biogenesis, lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT).

## INTRODUCTION

apoA-I (apolipoprotein A-I) is the major protein component of HDL (high-density lipoprotein) and plays an essential role in the biogenesis, structure, function and plasma concentration of HDL [1–6]. HDL is synthesized through a complex pathway that involves various membrane-bound proteins, plasma enzymes and lipid transfer proteins [7].

Several naturally occurring apoA-I mutations that produce pathological phenotypes have been described [7–12]. It has been estimated that structural mutations of apoA-I occur in 0.3 % of the Japanese population and may affect the plasma HDL levels. Seventeen out of a total of 46 naturally occurring apoA-I mutants have reduced capacity to activate LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase). These mutations are clustered predominantly in or at the vicinity of helix 4 of apoA-I, based on the new X-ray crystal structure [13]. Some of them predispose to atherosclerosis [8–12,14]. In recent studies, using adenovirus-mediated gene transfer in apoA-I<sup>-/-</sup> mice, we were able to identify mutations in apoA-I that affected different steps in the biogenesis of HDL. This includes mutations that affect the apoA-I–ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) interactions and prevent formation of  $\alpha$ -HDL particles [15], mutations that affect the activation of LCAT, which is required for the esterification of the cholesterol of the HDL particles [16], mutations that affect the activity of the plasma

PLTP (phospholipid transfer protein) and cause dyslipidaemia [17] and mutations that cause hypertriglyceridaemia [17,18].

The objective of the present study was to investigate how important mutations in helix 4 of apoA-I [13] affect the plasma HDL levels. We have focused on two naturally occurring apoA-I mutations [apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> and apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>] and one bioengineered mutation apoA-I(R149A). Replacement of Arg<sup>149</sup> by non-charged residues diminishes the only significant positive electrostatic potential that is found in the 149–160 region of apoA-I and reduces the LCAT activation capacity of the mutant protein *in vitro* [19].

Using adenovirus-mediated gene transfer of these mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice, we found that a common feature of the three mutations is the low HDL levels and the presence of discoidal particles in plasma. These defects could be corrected by co-infection of apoA-I<sup>-/-</sup> mice with adenoviruses expressing the mutant proteins along with human LCAT, indicating that the endogenous LCAT is rate limiting in the conversion of discoidal into spherical HDL.

## EXPERIMENTAL

### Materials

Materials not mentioned in the Experimental section have been obtained from sources described previously [2,18].

Abbreviations used: ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; apoA-I, apolipoprotein A-I; CE, cholesteryl ester; cpt-cAMP, 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP; EM, electron microscopy; GFP, green fluorescent protein; HDL, high-density lipoprotein; LCAT, lecithin:cholesterol acyltransferase; LDL, low-density lipoprotein; MOI, multiplicity of infection; pfu, plaque-forming units; rHDL, reconstituted HDL; TC, total cholesterol; WT, wild-type.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email vzannis@bu.edu).

### Generation of adenoviruses expressing the WT (wild-type) and the mutant apoA-I forms

The apoA-I gene lacking the BglIII restriction site (that is present at nucleotide positions 181 of the genomic sequence relative to the ATG codon of the gene) was cloned into the pcDNA3.1 vector to generate the pcDNA3.1-apoA-I( $\Delta$ BglIII) plasmid (as described in Supplementary Table 1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/406/bj4060167add.htm>). This plasmid was used as a template to introduce the apoA-I mutations apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(R149A) and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> by using the QuikChange<sup>®</sup> XL mutagenesis kit (Stratagene). The 2.2 kb apoA-I inserts containing the WT or mutant forms of apoA-I were cloned into the pAdTrackCMV vector, which was used to generate the adenoviral constructs by recombination in the bacteria cells BJ-5183-AD1, following the pAd-Easy-1 protocol (Stratagene). Correct clones were propagated in DH5a bacteria cells. The recombinant adenoviral constructs were linearized after digestion with PacI and used to transfect 911 cells. Following large-scale infection of HEK-293 (human embryonic kidney 293) cell cultures, the recombinant adenoviruses were purified by two consecutive CsCl ultracentrifugation steps, dialysed and titrated. The first centrifugation was carried out at 35 000 rev./min for 90 min using an SW41 Beckman rotor and the second at 50 000 rev./min for 1 h using a Ti70 Beckman rotor.

### Cell secretion of WT and mutant apoA-I forms

To assess the secretion of WT and mutant apoA-I forms, HTB13 cells (SW 1783 human astrocytoma) grown to 80% confluence in Leibovitz's L-15 medium containing 2% (v/v) heat-inactivated horse serum in 100 mm diameter dishes were infected with adenoviruses expressing the WT or mutant apoA-I form at an MOI (multiplicity of infection) of 20. Twenty-four hours post-infection, the cells were washed twice with PBS and incubated in serum-free medium for 2 h. Following an additional wash with PBS, fresh serum-free medium was added. After 24 h of incubation, medium was collected and analysed by SDS/PAGE for apoA-I expression.

### Production and purification of WT and mutant apoA-I forms using the adenovirus system

apoA-I was purified from the culture medium of HTB13 cells grown in roller bottles. The cells were infected with the adenoviruses expressing the WT apoA-I, apoA-I(R149A), apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> or apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>. The medium was harvested every 24 h after infection and the protein was purified as described in [4].

### LCAT activation assay

LCAT was purified as described in [18] from the culture medium of human HTB13 cells infected with an adenovirus expressing the human LCAT cDNA [20]. The rHDL (reconstituted HDL) particles, used as the substrate, contained cholesterol and [<sup>14</sup>C]-cholesterol ([4-<sup>14</sup>C]cholesterol; 0.04 mCi/ml; specific activity of 45 mCi/mmol; PerkinElmer Life Sciences), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine) and apoA-I and were prepared by the sodium cholate dialysis method as described previously [21]. The enzymatic reactions were carried out as described and the apparent  $V_{max}$  and  $K_m$  were derived as described previously [16].

### ABCA1-dependent cholesterol efflux assay

ABCA1-dependent efflux of cholesterol was measured by using J774 macrophages in which expression of ABCA1 was induced

by a cAMP analogue using WT and mutant apoA-I forms as cholesterol acceptors. The J774 mouse macrophages were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 4.5 g/l glucose, 10% (v/v) foetal bovine serum and antibiotics, labelled with 8  $\mu$ Ci/ml [<sup>14</sup>C]cholesterol for 24 h and then treated with 0.3 mM cpt-cAMP [8-(4-chlorophenylthio)-cAMP] for 24 h. Cholesterol efflux was determined as described previously [2].

### Animal studies, plasma lipids and apoA-I

apoA-I<sup>-/-</sup> (apoA-I<sup>tm1Unc</sup>) C57BL/6J mice [22] were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Bar Harbor, ME, U.S.A.). The mice were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle and standard rodent chow. All procedures performed on the mice were in accordance with NIH (National Institutes of Health) and institutional guidelines. apoA-I<sup>-/-</sup> mice 6–8 weeks of age were injected via tail vein with 1–2  $\times$  10<sup>9</sup> pfu (plaque-forming units) of recombinant adenovirus per animal and the animals were killed 4 days post-injection following a 4 h fast. The concentration of TC (total cholesterol), free cholesterol, phospholipids and triacylglycerols of plasma drawn 4 days post-infection was determined by using the cholesterol E, free cholesterol C and phospholipids B reagents (Wako Chemicals) and INFINITY triacylglycerols reagent (ThermoDMA) respectively according to the manufacturer's instructions. The concentration of CEs (cholesteryl esters) was determined by subtracting the concentration of free cholesterol from the concentration of TC. Plasma apoA-I levels were determined using the AutoKit-AI (Wako Chemicals). For FPLC analysis of plasma, 17  $\mu$ l of plasma obtained from mice infected with adenovirus-expressing WT or mutant apoA-I forms was loaded on to a Sepharose 6 PC column in a SMART microFPLC system (Amersham Biosciences) and eluted with PBS. A total of 25 fractions of 50  $\mu$ l volume each were collected for further analysis. The concentration of lipids in the FPLC fractions was determined as described above.

### Fractionation of plasma by density-gradient ultracentrifugation and EM (electron microscopy) analysis of the apoA-I-containing fractions

For this analysis, 300  $\mu$ l of plasma obtained from adenovirus-infected mice was fractionated by density-gradient ultracentrifugation as described in [16]. Aliquots of 100  $\mu$ l from each fraction were subjected to SDS/PAGE and the protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue. For EM analysis, the fractions that float in the HDL region were treated and photographed as described in [16].

### Non-denaturing two-dimensional gel electrophoresis

The distribution of HDL subfractions in plasma was analysed by two-dimensional electrophoresis as described in [16]. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and apoA-I was detected using the goat polyclonal anti-human apoA-I antibody AB740 (Chemicon International).

### RNA isolation and hybridization analysis

Total RNA was isolated from liver tissue of mice 4 days post-infection, using TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The RNA was analysed by Northern blotting and the apoA-I and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase) mRNA bands were detected and quantified as described in [18].

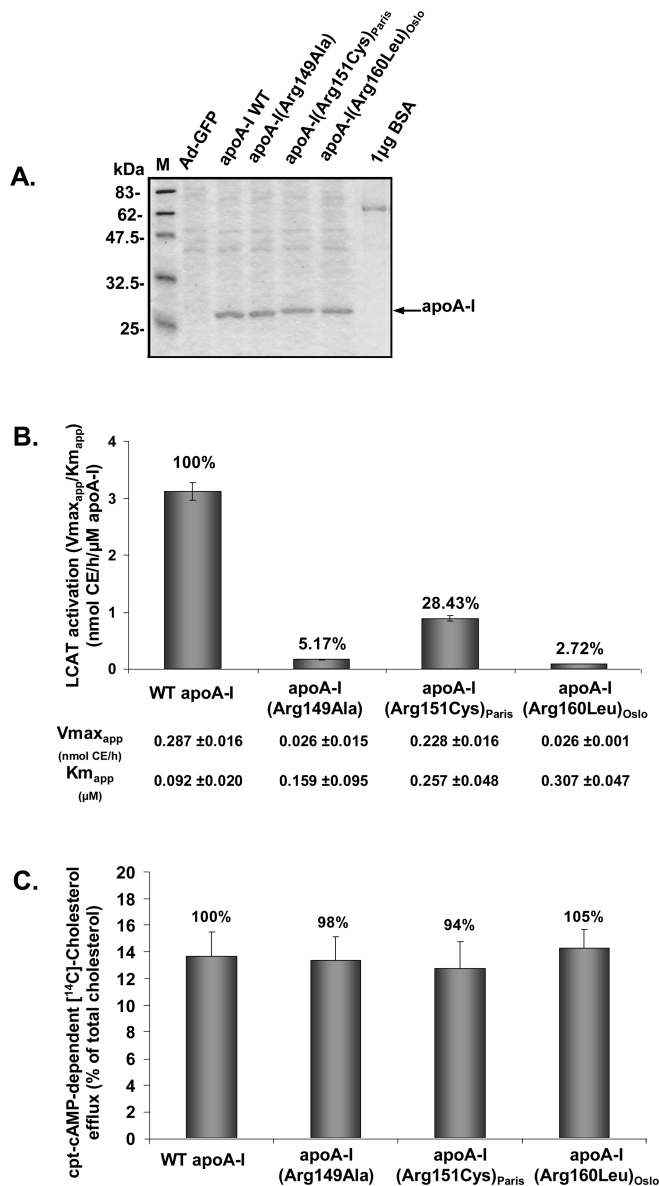
## RESULTS

### Protein expression and ability of mutant apoA-I forms to activate LCAT and promote ABCA1-mediated cholesterol efflux *in vitro*

We have generated recombinant adenoviruses expressing the WT apoA-I and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) mutants and studied the properties of the mutant proteins *in vitro* and *in vivo*. The first two mutations are encountered in human patients [23,24]. The third represents a newly bio-engineered variant. To assess the expression and secretion of the three mutants, compared with WT apoA-I, we infected HTB13 (human astrocytoma) cells with recombinant adenoviruses harbouring the WT or the mutant apoA-I genes, using an MOI of 20. Analysis of the cultured media 24 h post-infection showed that the WT and the mutant forms were secreted at comparable levels in the medium (Figure 1A).

For the LCAT activation, WT and the three mutant forms of apoA-I were produced by the adenovirus expression system and were used for generation of discoidal rHDL particles, as described in [17,18]. The LCAT activity was assayed as the rate of production of labelled CEs from the [<sup>14</sup>C]cholesterol-labelled rHDL particles. The LCAT-catalysed esterification of the cholesterol of the rHDL particles containing the apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> was performed with normal concentration of LCAT in the reaction mixture. The initial velocity of the LCAT-catalysed esterification of the cholesterol of the rHDL particles containing the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) mutants when performed with normal LCAT concentration was very low, but could be increased proportionately by increasing the concentration of LCAT in the reaction mixture. We found that a 20-fold increase in enzyme concentration using the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) mutants resulted in an initial velocity of esterification that was comparable with that obtained using 1-fold enzyme concentration and WT apoA-I. Taking into account the enzyme concentrations used, the  $V_{max}$  (app) and as well as the  $K_m$  (app) values of the mutants were calculated and compared with those of the WT apoA-I and are shown in Figure 1(B). The relative  $V_{max}/K_m$  for apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) were 28.4, 2.7 and 5.2% nmol of CE · h<sup>-1</sup> · (μM of apoA-I)<sup>-1</sup> respectively (Figure 1B). Compared with WT apoA-I, mutant apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) had greatly reduced  $V_{max}$  (app) values and 3.3- and 1.7-fold increase in  $K_m$  (app) values respectively, whereas mutant apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> had near normal  $V_{max}$  (app) and 2.8-fold increase in  $K_m$  (app) (Figure 1B).

The ability of the three apoA-I mutants to promote ABCA1-mediated cholesterol efflux was determined by using J774 mouse macrophages that were stimulated by the cAMP analogue cpt-cAMP. The net cpt-cAMP-dependent cholesterol efflux from J774 macrophages by using the mutant proteins as cholesterol acceptors was obtained by subtracting the efflux values of the untreated cells from the efflux values of the CIPhS-cAMP-treated cells, after a 4 h incubation. The efflux values obtained for WT apoA-I were set to 100%. This analysis showed that the cpt-cAMP-dependent (ABCA1-mediated) cholesterol efflux in the presence of apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) acceptor was 94, 105 and 98% of the WT control (Figure 1C). Previous *in vitro* studies also indicated reduced LCAT activation and normal cholesterol efflux capacity for these mutants [25,26]. The *in vivo* effects of these mutations on the biogenesis of HDL were not studied previously.



**Figure 1** apoA-I expression and *in vitro* functional assays

(A) SDS/PAGE analysis of 100 μl of culture medium of HTB13 cells infected with control adenovirus expressing GFP, adenovirus expressing WT or the mutants apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A). apoA-I levels can be assessed qualitatively by comparison with the intensity of the band of a sample containing 1 μg of BSA. 'M' indicates protein markers. (B) Activation of LCAT by rHDL containing WT or mutant apoA-I forms. The apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values are given at the bottom of the Figure. The catalytic efficiency of the enzyme, expressed as the  $V_{max}$  (app)/ $K_m$  (app) ratio, is plotted and expressed as percentage of WT control. Values are the means ± S.D. for three independent experiments performed in duplicate. (C) cAMP-dependent (ABCA1-mediated) cholesterol efflux from J774 murine macrophages in the presence of WT apoA-I, apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> or apoA-I(R149A), as indicated, was determined as described in the Experimental section. Values are the means ± S.D. for three independent experiments performed in duplicate.

### Plasma lipid, apoA-I and hepatic apoA-I mRNA levels following adenovirus infection

Mice were infected with doses ranging from 1 to  $2 \times 10^9$  pfu in order to achieve hepatic mRNA levels that were comparable with the levels obtained in mice infected with WT apoA-I. Higher doses of the mutant forms were also used to look for potential changes in the observed phenotypes (Supplementary Table 2

**Table 1** Comparison of plasma lipids and apoA-I levels and hepatic mRNA levels of apoA-I<sup>-/-</sup> mice, 4 days post-infection with recombinant adenoviruses expressing the WT apoA-I, the apoA-I mutants or the control protein GFP

Values are means ± S.D. (n = 4–6).

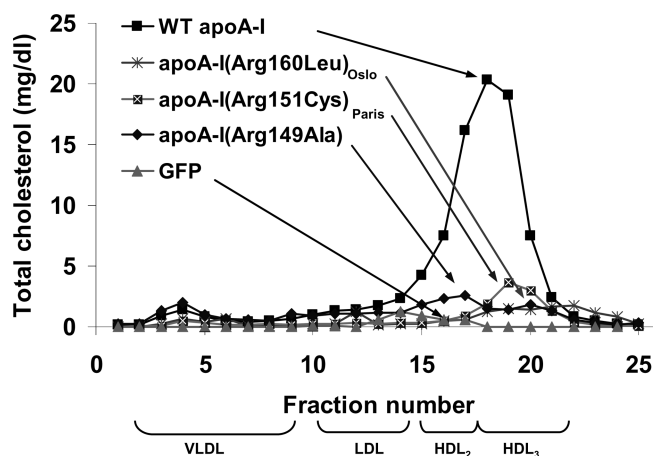
Protein expressed	Cholesterol (TC) (mg/dl)	Free cholesterol (mg/dl)	CEs (mg/dl)	CE/TC	Triacylglycerols	Phospholipids	Relative apoA-I mRNA (%)	apoA-I protein (mg/dl)
WT apoA-I	190 ± 43	51 ± 15	139 ± 28	0.73 ± 0.06	76 ± 16	381 ± 85	100 ± 15	204 ± 47
GFP	40 ± 5	19 ± 6	21 ± 3	0.53 ± 0.01	45 ± 4	78 ± 8	–	–
apoA-I(R151C) <sub>Paris</sub>	75 ± 6	32 ± 8	42 ± 9	0.52 ± 0.08	10 ± 4	119 ± 12	63 ± 10	91 ± 11
apoA-I(R151C) <sub>Paris</sub> + LCAT	437 ± 89	143 ± 22	294 ± 66	0.67 ± 0.01	104 ± 29	561 ± 86	64 ± 5	199 ± 52
apoA-I(R149A)	78 ± 10	43 ± 12	35 ± 2	0.44 ± 0.06	47 ± 8	138 ± 21	115 ± 12	75 ± 26
apoA-I(R149A) + LCAT	216 ± 67	64 ± 21	152 ± 43	0.70 ± 0.02	54 ± 6	213 ± 80	50 ± 6	188 ± 68
apoA-I(R160L) <sub>Oslo</sub>	43 ± 13	33 ± 8	10 ± 3	0.23 ± 0.01	36 ± 4	116 ± 48	117 ± 30	66 ± 31
apoA-I(R160L) <sub>Oslo</sub> + LCAT	250 ± 47	45 ± 7	205 ± 41	0.82 ± 0.01	62 ± 11	277 ± 73	60 ± 1	127 ± 26
Untreated mice								
apoA-I <sup>-/-</sup>	30 ± 9	11 ± 2	19 ± 6	0.63 ± 0.02	30 ± 5	52 ± 12	–	–
C57BL/6	88 ± 10	24 ± 2	64 ± 15	0.72 ± 0.05	31 ± 7	150 ± 15	–	–

of the Supplementary data at <http://www.BiochemJ.org/bj/406/bj4060167add.htm>). Treatment of apoA-I<sup>-/-</sup> mice with a control adenovirus expressing the GFP (green fluorescent protein) did not change their plasma lipid levels, compared with the untreated apoA-I<sup>-/-</sup> mice. Potential liver damage following adenovirus infection was assessed by measuring serum transaminases using Refflotron Plus system (Roche). These analyses showed normal serum transaminase levels when mice were infected with  $2 \times 10^9$  pfu recombinant adenoviruses. Analysis of plasma lipids and apoA-I levels, 4 days post-infection, showed that, compared with mice expressing WT apoA-I, the mice expressing any of the three mutants had in general reduced total plasma cholesterol levels and reduced plasma CE/TC ratio. The triacylglycerol and phospholipid plasma levels in mice expressing the three mutants were also reduced as compared with mice expressing the WT apoA-I (Table 1).

There were differences in the lipid phenotypes of the mice expressing the three apoA-I mutants. Mice expressing the mutants apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(R149A) and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> had 22, 41 and 39 % plasma cholesterol and 32, 36 and 45 % apoA-I levels respectively, as compared with mice expressing the WT apoA-I. The CE/TC ratio of the plasma of mice expressing the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(R149A) and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> mutants was 0.23, 0.44 and 0.52 respectively, indicating some kind of defect in the esterification of the HDL cholesterol due to the reduced ability of these apoA-I mutants to activate the endogenous LCAT *in vivo*.

FPLC analysis of plasma showed that the HDL cholesterol peak of the mice expressing any of the three mutants was very small compared with mice expressing the WT apoA-I, while the apoA-I mRNA levels of mice expressing these mutants and the WT apoA-I were comparable thus indicating defective biogenesis of HDL (Figure 2 and Table 1). In mice expressing the apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> mutant the HDL cholesterol peak was shifted towards the HDL3 region (Figure 2). A similar shift was observed when higher doses of adenoviruses expressing the three mutants were used (Supplementary Figure 1 of the Supplementary data at <http://www.BiochemJ.org/bj/406/bj4060167add.htm>).

Analysis of the distribution of apoA-I following density-gradient ultracentrifugation of plasma showed that in mice expressing the WT apoA-I, the protein was equally distributed in the HDL2 and HDL3 region (Figure 3A). Consistent with the FPLC data (Figure 2), in mice expressing apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) the apoA-I levels were reduced and most of the apoA-I protein was distributed in the HDL3 region and small

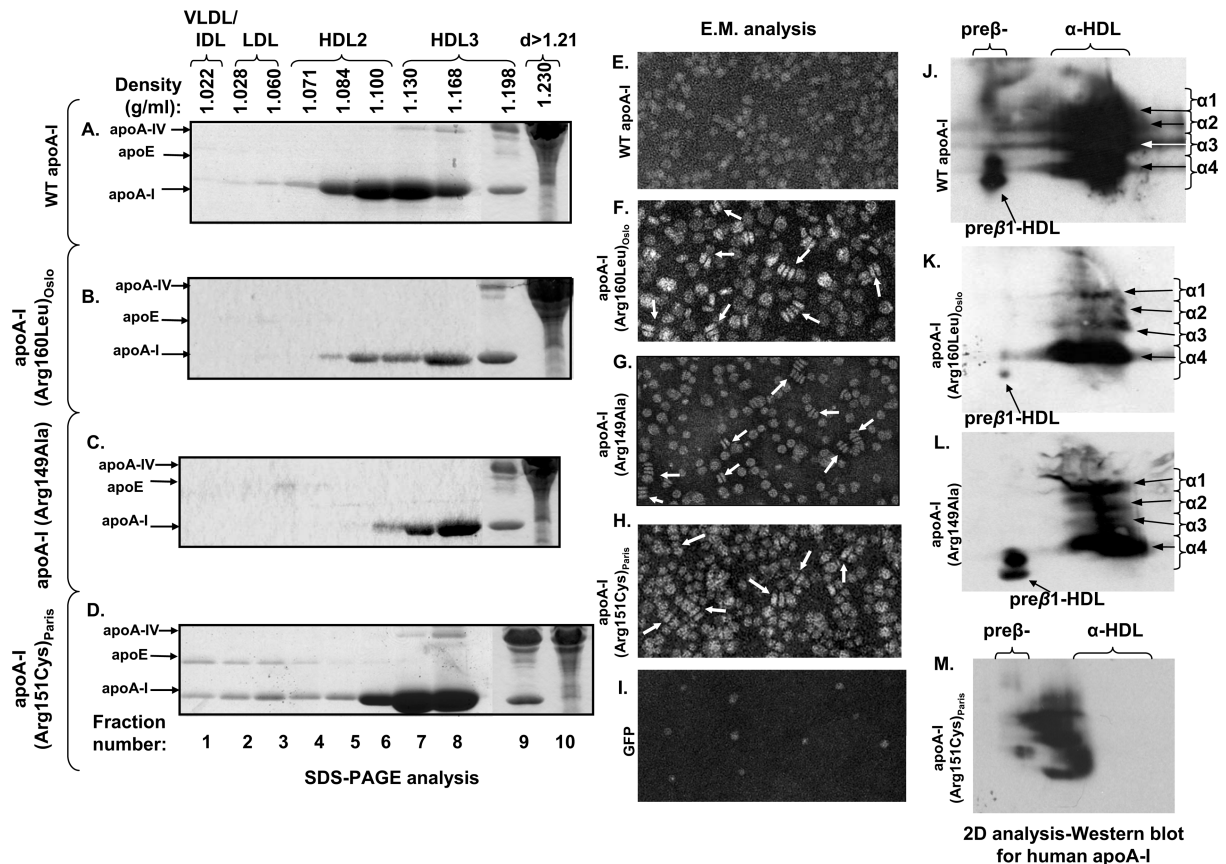
**Figure 2** FPLC profiles of TC in plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with  $1 \times 10^9$  pfu of adenoviruses expressing the WT apoA-I, apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(R149A) or the control protein GFP

Plasma samples were obtained from mice infected with the recombinant adenoviruses, 4 days post-infection.

amounts in the HDL2 region (Figures 3B and 3C respectively). In mice expressing the apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> mutant, the apoA-I levels were reduced to a lesser extent and the mutant apoA-I was distributed predominantly (80 %) in the HDL3 region and the remainder in the HDL2 region. Small amounts of apoA-I were also present in the lower density fractions (Figure 3D).

Analysis by EM of the HDL fraction 6, obtained by density-gradient ultracentrifugation (Figures 3A–3D), showed that WT apoA-I promoted the formation of spherical particles (Figure 3E), whereas the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> and apoA-I(R149A) mutants promoted the formation of a mixture of discoidal and spherical HDL particles (Figures 3F and 3G respectively). The apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> mutant promoted the formation of mostly spherical and fewer discoidal particles (Figure 3H). The HDL fraction obtained from mice infected with the control adenovirus expressing GFP contained only few spherical particles (Figure 3I) that were similar in numbers to the particles observed in the HDL fraction of the untreated apoA-I<sup>-/-</sup> mice (results not shown).

Two-dimensional gel electrophoresis of plasma from mice expressing the WT or the mutant apoA-I forms showed that the WT apoA-I formed  $\alpha$ -HDL particles and smaller amounts



**Figure 3** Analyses of plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with adenoviruses expressing the WT apoA-I (A, E, J), the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> (B, F, K), apoA-I(R149A) (C, G, L), the apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> (D, H, M) or the control adenovirus expressing GFP (I) by density-gradient ultracentrifugation, SDS/PAGE and two-dimensional gel electrophoresis

(A–C) SDS/PAGE analysis of density-gradient ultracentrifugation fractions. The densities of the fractions are indicated on the top of the Figure. (E–I) EM pictures of HDL fraction 6 obtained from apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the WT apoA-I, the mutant forms or the control adenovirus expressing GFP, following density-gradient ultracentrifugation of plasma. The arrows indicate discoidal HDL particles. (J–M) Two-dimensional (2D) gel electrophoresis and Western-blot analysis of plasma obtained from mice infected with adenoviruses expressing the WT or the mutant forms of apoA-I, as indicated. The arrows indicate the different HDL subpopulations.

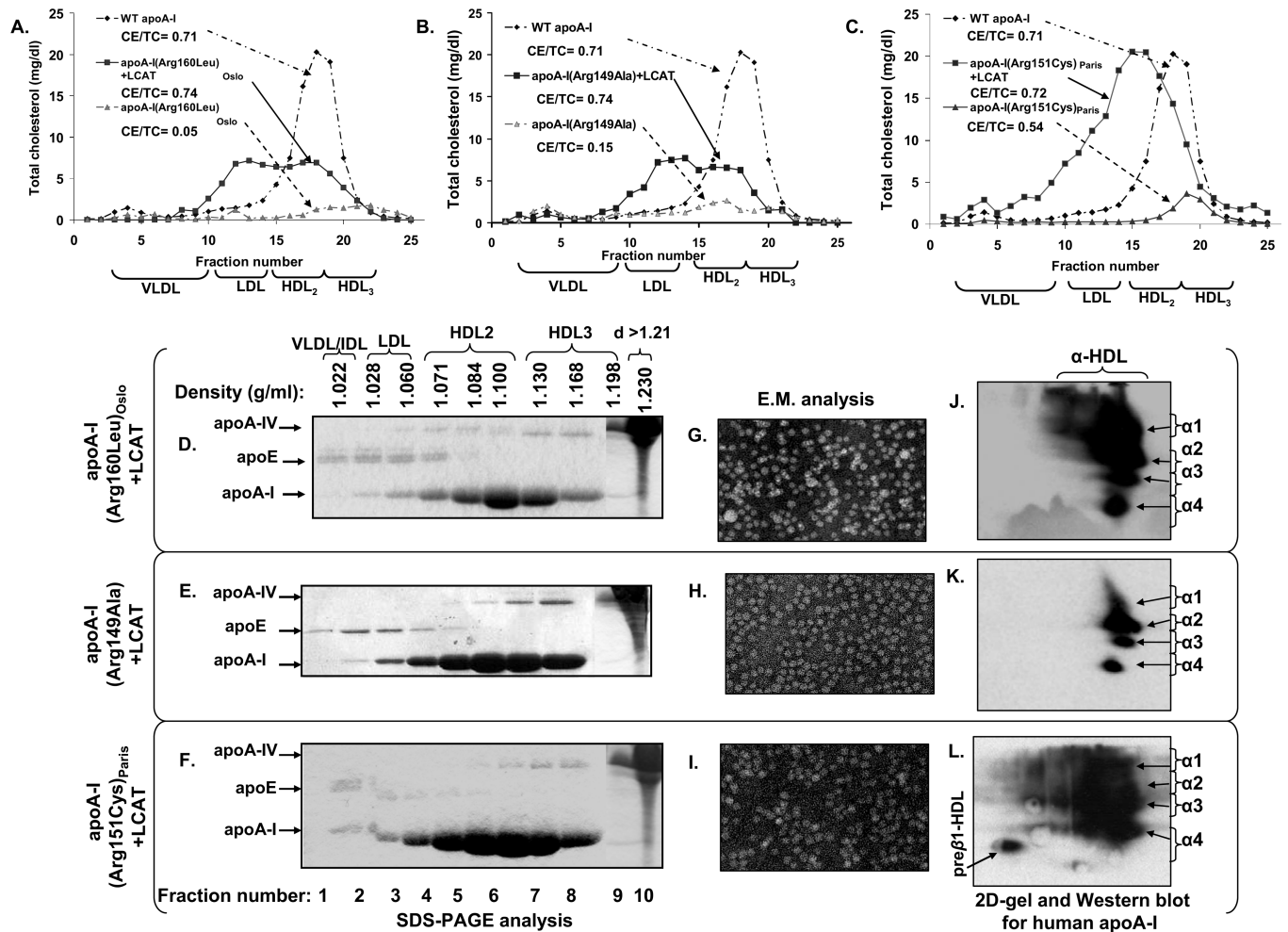
of pre $\beta$ <sub>1</sub>-HDL particles (Figure 3J). Mice expressing the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> formed predominantly  $\alpha$ 4-HDL of fast electrophoretic mobility and small amounts of pre $\beta$ <sub>1</sub>-HDL and  $\alpha$ 3- and  $\alpha$ 2-HDL subpopulations with slower electrophoretic mobility (Figure 3K). The apoA-I(R149A) formed pre $\beta$ <sub>1</sub> and  $\alpha$ 4-HDL particles and small amounts of  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- and  $\alpha$ 3-HDL particles of slower electrophoretic mobility (Figure 3L). The apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> formed subpopulations of different sizes that migrated between pre $\beta$  and  $\alpha$ -HDL (Figure 3M; see Supplementary Figures 2A–2D of the Supplementary data at <http://www.BiochemJ.org/bj/406/bj4060167.add.htm>).

#### Plasma lipids, FPLC profiles, the distribution of HDL in different densities and the size and shape of HDL in mice infected with adenoviruses expressing the three mutant apoA-I forms in combination with human LCAT

To assess how apoA-I mutations affect the biogenesis of HDL, apoA-I<sup>-/-</sup> mice were co-infected with a mixture of adenoviruses expressing apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(R149A) or apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> (using  $1 \times 10^9$  pfu) along with human LCAT (using  $5 \times 10^8$  pfu). The co-infection with LCAT and each of the three mutants had a dramatic effect on plasma cholesterol and apoA-I levels. Compared with mice infected with adenoviruses

expressing the mutant apoA-I forms alone, mice co-infected with adenoviruses expressing LCAT and the apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub>, apoA-I(R149A) and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> mutants had a 1.9-, 2.5- and 2.2-fold increase in plasma apoA-I respectively. The increase in TC was 5.8-, 2.8- and 5.8-fold respectively, and the increase in esterified cholesterol was 21-, 4.3- and 7-fold respectively (Table 1). The LCAT treatment also normalized the CE/TC ratio (Table 1). These increases were observed despite the lower levels of hepatic apoA-I mRNA expression in mice treated with combination of LCAT and the mutant apoA-I forms, as compared with mice treated with the mutant apoA-I forms alone (Table 1).

Figures 4(A)–4(C) show the FPLC profiles of cholesterol in mice treated with a combination of human LCAT and apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> (Figure 4A), apoA-I(R149A) (Figure 4B) and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> (Figure 4C) and compare them with the profiles of mice treated with the WT or the corresponding mutant apoA-I forms alone. These analyses showed that all the increase in cholesterol could be attributed to the increase in cholesterol that floats in the HDL2 and HDL1 region [that overlaps with the LDL (low-density lipoprotein) density range]. The apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> gave a continuous HDL peak that is shifted to the lower densities, whereas the HDL of apoA-I(R149A) and apoA-I(R160L)<sub>Oslo</sub> gave two distinct peaks corresponding to HDL2 and HDL1 (Figures 4A–4C).



**Figure 4** Analyses of plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with a combination of adenoviruses expressing human LCAT ( $5 \times 10^8$  pfu) and apoA-I(R160L)<sub>Ostlo</sub> ( $1 \times 10^9$  pfu), apoA-I(R149A) ( $1 \times 10^9$  pfu) or apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> ( $1 \times 10^9$  pfu) mutants

(A–C) FPLC profiles of TC and comparison with the corresponding profiles of plasma obtained from apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the WT apoA-I or each of the three apoA-I mutants alone, as indicated. The CE/TC ratio of HDL fractions 15–22 of the FPLC is indicated. (D–F) SDS/PAGE profiles of fractions obtained by density-gradient ultracentrifugation analysis of plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the mutant forms of apoA-I in combination with the human LCAT, as indicated. (G–I) EM pictures of HDL fraction 6, following density-gradient ultracentrifugation of plasma obtained from apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the indicated mutant forms in combination with human LCAT. (J–L) Two-dimensional gel electrophoresis and Western blot analysis of plasma obtained from mice infected with adenoviruses expressing the WT or the mutant forms of apoA-I, as indicated. The arrows indicate the different HDL subpopulations.

The LCAT treatment in mice expressing any of the three mutants also normalized the CE/TC ratio of HDL (Figures 4A–4C).

Fractionation of plasma by density-gradient ultracentrifugation and SDS/PAGE analysis of the fractions confirmed the increase in plasma apoA-I levels shown in Table 1. The plasma apoA-I for the three mutants was shifted towards the HDL<sub>2</sub> region, whereas smaller amounts of apoA-I were found in the HDL<sub>3</sub> region and the LDL density range (Figures 4D–4F). The distribution of apoA-I assessed by ultracentrifugation and SDS/PAGE analysis is consistent with the distribution of HDL cholesterol of the three mutants relative to WT apoA-I, as determined by FPLC analysis (compare Figures 4D–4F with Figures 4A–4C).

The co-infection of the mutant apoA-I forms with LCAT increased the concentration of apoE in the VLDL (very-low-density lipoprotein)/IDL (intermediate-density lipoprotein)/LDL region. It also increased the concentration of apoA-IV in the HDL<sub>3</sub> and, to a lesser extent, in the HDL<sub>2</sub> region (compare Figures 3B and 3C with Figures 4D and 4E).

The LCAT treatment promoted the formation of spherical HDL particles similar to those formed by WT apoA-I (compare

Figure 3E with Figures 4G–4I) and restored the larger size HDL subpopulations in the plasma. In mice infected with the apoA-I(R160L)<sub>Ostlo</sub> and apoA-I(R149A) the preβ-HDL disappeared and the relative concentration of the α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub> and α<sub>1</sub> particles increased, whereas in mice expressing the apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> the preβ to α-HDL ratio appears normal (Figures 4J–4L).

## DISCUSSION

In previous studies, we considered the HDL biogenesis as a continuous pathway where apoA-I and various participating proteins interact successively to form initially preβ-HDL and subsequently discoidal and spherical HDL particles that are biologically active [7]. Gene transfer of apoA-I mutants to apoA-I<sup>-/-</sup> mice identified discrete steps in the HDL pathway, where intermediates cannot be converted into products and therefore accumulate in plasma [2,16–18,27] or are degraded [15].

In the present study, we used the same strategy to assess the impact of two naturally occurring apoA-I mutations, apoA-I(R160L)<sub>Ostlo</sub> and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub>, and a newly bioengineered

mutation, apoA-I(R149A), on the biogenesis of HDL. Both Arg<sup>160</sup> and Arg<sup>149</sup> are thought to contribute to the positive electrostatic potential of apoA-I [19]. The phenotypes that emerged following adenovirus-mediated gene transfer of the naturally occurring apoA-I mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice are expected to be similar to the phenotypes of homozygous subjects carrying either of the two natural apoA-I mutations [23,24]. Currently, only the phenotypes of heterozygotes patients are available. In addition, animal models that express transiently the mutant proteins may be used to identify potential therapies for the low HDL syndromes. In our studies, the formation of HDL was assessed by FPLC fractionation and two-dimensional gel electrophoresis of plasma that can identify potential defects in the formation of HDL and imbalances in the pre $\beta$  and  $\alpha$ -HDL subpopulations [17]. Other parameters that indicate abnormalities in HDL biogenesis are the CE/TC ratio of HDL, the skewed distribution of apoA-I towards the HDL3 region and the ability of the mutant proteins to drive the formation of spherical and/or discoidal HDL particles as determined by EM [16,17]. The function of the apoA-I mutants was also assessed by two informative *in vitro* assays.

The capacity of apoA-I mutants to promote ABCA1-mediated cholesterol efflux indicates potential defects in the functional interactions between apoA-I and ABCA1 that lead to the initial lipidation of apoA-I [28]. The capacity of apoA-I to esterify the cholesterol of rHDL particles may indicate potential defects that inhibit the maturation of the lipidated apoA-I and the formation of spherical HDL particles. Consistent with previous findings [25,26,29,30], our *in vitro* assays showed that the three mutants had near normal capacity to promote ABCA1-mediated lipid efflux and greatly reduced capacity to activate LCAT.

Gene transfer of apoA-I(R160L)<sub>Oslø</sub> and apoA-I(R149A) mutants in apoA-I<sup>-/-</sup> mice resulted in a great reduction of total plasma apoA-I and HDL cholesterol levels, as compared with WT apoA-I. It also promoted formation of pre $\beta$ -HDL and small size  $\alpha$ 4-HDL particles, accumulation of discoidal HDL particles in plasma, decreased CE/TC ratio of the plasma and the HDL fraction and caused a shift of apoA-I and HDL towards the HDL3 region. The phenotypes produced by adenovirus-mediated gene transfer of apoA-I(R149A) or apoA-I(R160L)<sub>Oslø</sub> were similar. A similar phenotype has been previously produced by replacement of Arg<sup>160</sup>/His<sup>162</sup> by valine and alanine respectively [16].

Our findings are consistent with previous studies that showed that heterozygotes of apoA-I(R160L)<sub>Oslø</sub> have approx. 60 and 70 % of normal HDL and apoA-I levels respectively, form pre $\beta$ 1 and small size  $\alpha$ -HDL particles and have a 30 % reduction in their plasma LCAT activity [24].

Heterozygotes for apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> had approx. 50 % of normal plasma HDL cholesterol and apoA-I levels, reduced plasma LCAT activity and a shift of HDL towards the HDL3 region [23]. Carriers of apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> mutation did not have manifestations of coronary heart disease [23]. This may be the result of the antioxidant properties of this mutant that has a free cysteine moiety located near the interface of the hydrophobic/hydrophilic surface of the  $\alpha$ -helix [31].

**LCAT treatment can correct the HDL abnormalities brought about by the mutations apoA-I(R160L)<sub>Oslø</sub>, apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> and apoA-I(R149A) and suggest a mechanism responsible for the HDL deficiency observed in human patients carrying the two natural apoA-I mutations**

Insights into the molecular aetiology of the low HDL levels observed in patients with apoA-I(R160L)<sub>Oslø</sub> and apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> were provided by treatment of apoA-I<sup>-/-</sup> mice with a combin-

ation of adenoviruses expressing apoA-I(R160L)<sub>Oslø</sub>, apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> or apoA-I(R149A) and the human LCAT. This treatment corrected the plasma apoA-I and HDL levels, normalized the CE/TC ratio, restored normal pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL subpopulations and led to the formation of spherical HDL particles.

The restoration of normal levels of apoA-I and HDL following treatment with LCAT supports the notion that apoA-I mutants are secreted efficiently by the liver but the ability of the endogenous LCAT to esterify the cholesterol of the discoidal particles is rate limiting. Due to the LCAT insufficiency, the discoidal HDL accumulates in plasma. The reduction of the plasma apoA-I and HDL levels most likely represents increased catabolism of the discoidal particles via the kidney by the cubilin receptor or other mechanisms [32,33].

In the presence of excess LCAT, the esterification of the cholesterol of the discoidal HDL particles promotes their conversion into spherical HDL, thus reducing the overall catabolism of HDL.

The diminished capacity of apoA-I mutants carrying amino acid substitutions in the 149–160 region to activate LCAT has been supported by the *in vitro* data of this and several previous studies [19,24–26,29,34]. It has been suggested that Arg<sup>160</sup> plays a direct role in the activation of LCAT [29], since mutagenesis of this residue does not change the structure and thermodynamic properties of the mutant protein, but has a major effect on the activation of LCAT [19,29]. Similarly, an Arg<sup>149</sup> to glutamic residue substitution had no effect on the structure and the thermodynamic stability of apoA-I but diminished the capacity of the mutant protein to activate LCAT [19].

It has been suggested that Arg<sup>149</sup>, Arg<sup>153</sup> and Arg<sup>160</sup>, which are located in the hydrophobic/hydrophilic boundary of the amphipathic helix, create the only significant positive electrostatic potential around apoA-I [19]. In the ‘belt’ model these residues do not form interhelical salt bridges with the corresponding antiparallel repeat 99–120 but can form either intrahelical salt bridges or can be free to have electrostatic interactions with LCAT and thus promote its activation [19].

When Arg<sup>149</sup> or Arg<sup>160</sup> are replaced by alanine or other hydrophobic residues, the overall hydrophobicity increases and the positive electrostatic potential of this region decreases. The reduction in the positive electrostatic potential of these mutants may account for their diminished ability to activate LCAT *in vitro* and *in vivo*. The diminished capacity of apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> to activate efficiently LCAT *in vitro* and *in vivo* may be related to a different registration of the two antiparallel apoA-I helices as compared with WT apoA-I, due to the formation of a disulfide bond between the two Cys<sup>151</sup> residues [35].

Taken together with previous studies, our data suggest the following events that account for the abnormal HDL phenotypes and the low HDL levels of humans and experimental animals expressing apoA-I(R160L)<sub>Oslø</sub>, apoA-I(R151C)<sub>Paris</sub> and apoA-I(R149A). Following the initial lipidation of apoA-I by ABCA1, the complex proceeds to form discoidal particles. However, the activity of LCAT is rate limiting and the discoidal particles cannot be converted efficiently into spherical particles. This defective conversion is associated with low HDL levels, most likely due to the increased catabolism of the discoidal HDL particles [32,33]. The correction of the aberrant HDL phenotypes by treatment with LCAT suggests a potential therapeutic intervention for HDL abnormalities that result from specific mutations in apoA-I. Experimental interventions in animal models may involve, for instance, treatments that increase the expression of the endogenous LCAT gene and/or potential gene therapy in the future. Such treatments will have as their target not only the increase in HDL levels but also the protection from atherosclerosis.



This work was supported by the NIH grant (HL48739) the 6th Framework Programme of the European Union (no. LSHM-CT-2006-037631) and a grant by the Ministries of Development and Education of Greece (PENED-01 E $\Delta$ 619). We thank Dr Silvia Santamarina-Fojo for providing the adenovirus expressing the human LCAT, Anne Plunkett for preparing the paper and Gayle Forbes for technical assistance. G. K. is a graduate student of the Joint Graduate Programme in Molecular Biology and Biomedicine of the Department of Biology and the Department of Basic Sciences of the University of Crete Medical School.

## REFERENCES

- Zannis, V. I., Kardassis, D. and Zanni, E. E. (1993) Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors and their enzymes. *Adv. Hum. Genet.* **21**, 145–319
- Chroni, A., Liu, T., Gorshkova, I., Kan, H. Y., Uehara, Y., von Eckardstein, A. and Zannis, V. I. (2003) The central helices of apoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220–231 of the wild-type apoA-I are required for lipid efflux *in vitro* and high density lipoprotein formation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **278**, 6719–6730
- Chroni, A., Koukos, G., Duka, A. and Zannis, V. I. (2007) The carboxy-terminal region of apoA-I is required for the ABCA1-dependent formation of alpha-HDL but not prebeta-HDL particles *in vivo*. *Biochemistry* **46**, 5697–5708
- Laccotripe, M., Makrides, S. C., Jonas, A. and Zannis, V. I. (1997) The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **272**, 17511–17522
- Liu, T., Krieger, M., Kan, H. Y. and Zannis, V. I. (2002) The effects of mutations in helices 4 and 6 of apoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. *J. Biol. Chem.* **277**, 21576–21584
- Zannis, V. I., Chroni, A., Kypreos, K. E., Kan, H. Y., Cesar, T. B., Zanni, E. E. and Kardassis, D. (2004) Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 151–166
- 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
- Miller, M., Aiello, D., Pritchard, H., Friel, G. and Zeller, K. (1998) Apolipoprotein A-I (Zavalla) (Leu159  $\rightarrow$  Pro): HDL cholesterol deficiency in a kindred associated with premature coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1242–1247
- Hovingh, G. K., Brownlie, A., Bisoendial, R. J., Dube, M. P., Levels, J. H., Petersen, W., Dullaart, R. P., Stroes, E. S., Zwinderman, A. H., de Groot, E. et al. (2004) A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness and premature coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1429–1435
- Sorci-Thomas, M. G. and Thomas, M. J. (2002) The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 121–128
- Miettinen, H. E., Jauhiainen, M., Gylling, H., Ehnholm, S., Palomaki, A., Miettinen, T. A. and Kontula, K. (1997) Apolipoprotein A-IFIN (Leu159  $\rightarrow$  Arg) mutation affects lecithin cholesterol acyltransferase activation and subclass distribution of HDL but not cholesterol efflux from fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 3021–3032
- Huang, W., Sasaki, J., Matsunaga, A., Nanimatsu, H., Moriyama, K., Han, H., Kugi, M., Koga, T., Yamaguchi, K. and Arakawa, K. (1998) A novel homozygous missense mutation in the apo A-I gene with apo A-I deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 389–396
- Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M. and 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
- Miccoli, R., Bertolotto, A., Navales, R., Odoguardi, L., Boni, A., Wessling, J., Funke, H., Wiebusch, H., Eckardstein, A. and Assmann, G. (1996) Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I(L141R)Pisa and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications and coronary heart disease. *Circulation* **94**, 1622–1628
- Chroni, A., Duka, A., Koukos, G. and Zannis, V. I. (2006) The carboxy-terminal region of apoA-I is important for the biogenesis of HDL *in vivo*. *FEBS J.* **273**, 55–56
- Chroni, A., Duka, A., Kan, H. Y., Liu, T. and Zannis, V. I. (2005) Point mutations in apolipoprotein a-I mimic the phenotype observed in patients with classical lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Biochemistry* **44**, 14353–14366
- Chroni, A., Kan, H. Y., Shkodrani, A., Liu, T. and Zannis, V. I. (2005) Deletions of helices 2 and 3 of human ApoA-I are associated with severe dyslipidemia following adenovirus-mediated gene transfer in ApoA-I-deficient mice. *Biochemistry* **44**, 4108–4117
- Chroni, A., Kan, H. Y., Kypreos, K. E., Gorshkova, I. N., Shkodrani, A. and Zannis, V. I. (2004) Substitutions of glutamate 110 and 111 in the middle helix 4 of human apolipoprotein A-I (apoA-I) by alanine affect the structure and *in vitro* functions of apoA-I and induce severe hypertriglyceridemia in apoA-I-deficient mice. *Biochemistry* **43**, 10442–10457
- Roosbeek, S., Vanloo, B., Duverger, N., Caster, H., Breyne, J., De, B. I., Patel, H., Vandekerckhove, J., Shoulders, C., Rosseneu, M. and Peelman, F. (2001) Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* **42**, 31–40
- Amar, M. J. A., Shamburek, R. D., Foger, B., Hoyt, R. F., Wood, D. O., Santamarina-Fojo, S. and Brewer, H. B. (1998) Adenovirus-mediated expression of LCAT in non-human primates leads to an antiatherogenic lipoprotein profile with increased HDL and decreased LDL. *Circulation* **98**, 35
- Matz, C. E. and Jonas, A. (1982) Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J. Biol. Chem.* **257**, 4535–4540
- 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
- Bruckert, E., von Eckardstein, A., Funke, H., Beucler, I., Wiebusch, H., Turpin, G. and Assmann, G. (1997) The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-I-Milano. *Atherosclerosis* **128**, 121–128
- Leren, T. P., Bakken, K. S., Daum, U., Ose, L., Berg, K., Assmann, G. and von Eckardstein, A. (1997) Heterozygosity for apolipoprotein A-I(R160L)Oslo is associated with low levels of high density lipoprotein cholesterol and HDL-subclass LpA-I/A-II but normal levels of HDL-subclass LpA-I. *J. Lipid Res.* **38**, 121–131
- Daum, U., Leren, T. P., Langer, C., Chirazi, A., Cullen, P., Pritchard, P. H., Assmann, G. and von Eckardstein, A. (1999) Multiple dysfunctions of two apolipoprotein A-I variants, apoA-I(R160L)Oslo and apoA-I(P165R), that are associated with hypoalphalipoproteinemia in heterozygous carriers. *J. Lipid Res.* **40**, 486–494
- Daum, U., Langer, C., Duverger, N., Emmanuel, F., Benoit, P., Deneffe, P., Chirazi, A., Cullen, P., Pritchard, P. H., Bruckert, E. et al. (1999) Apolipoprotein A-I (R151C)Paris is defective in activation of lecithin: cholesterol acyltransferase but not in initial lipid binding, formation of reconstituted lipoproteins, or promotion of cholesterol efflux. *J. Mol. Med.* **77**, 614–622
- Reardon, C. A., Kan, H. Y., Cabana, V., Blachowicz, L., Lukens, J. R., Wu, Q., Liadaki, K., Getz, G. S. and Zannis, V. I. (2001) *In vivo* studies of HDL assembly and metabolism using adenovirus-mediated transfer of ApoA-I mutants in ApoA-I-deficient mice. *Biochemistry* **40**, 13670–13680
- Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Chroni, A., Mendez, A. J., Zannis, V. I. and Freeman, M. W. (2004) ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* **45**, 287–294
- Cho, K. H., Durbin, D. M. and Jonas, A. (2001) Role of individual amino acids of apolipoprotein A-I in the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase and in HDL rearrangements. *J. Lipid Res.* **42**, 379–389
- Sviridov, D., Hoang, A., Sawyer, W. H. and Fidge, N. H. (2000) Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **275**, 19707–19712
- Bielicki, J. K. and Oda, M. N. (2002) Apolipoprotein A-I (Milano) and apolipoprotein A-I (Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **41**, 2089–2096
- Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E. I., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Krahe, R. et al. (1999) The intrinsic factor–vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat. Med.* **5**, 656–661
- Hammad, S. M., Stefansson, S., Twal, W. O., Drake, C. J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer, Jr, H. B. and Argraves, W. S. (1999) Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor–vitamin B12 complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10158–10163
- Gorshkova, I. N., Liu, T., Kan, H. Y., Chroni, A., Zannis, V. I. and Atkinson, D. (2006) Structure and stability of apolipoprotein a-I in solution and in discoidal high-density lipoprotein probed by double charge ablation and deletion mutation. *Biochemistry* **45**, 1242–1254
- Klon, A. E., Jones, M. K., Segrest, J. P. and Harvey, S. C. (2000) Molecular belt models for the apolipoprotein A-I Paris and Milano mutations. *Biophys. J.* **79**, 1679–1685

Received 28 February 2007/15 May 2007; accepted 16 May 2007

Published as BJ Immediate Publication 16 May 2007, doi:10.1042/BJ20070296

## The Carboxy-Terminal Region of apoA-I Is Required for the ABCA1-Dependent Formation of $\alpha$ -HDL But Not Pre $\beta$ -HDL Particles in Vivo<sup>†</sup>

Angeliki Chroni,<sup>\*,‡</sup> Georgios Koukos,<sup>§,#</sup> Adelina Duka,<sup>§</sup> and Vassilis I. Zannis<sup>§</sup>

*Institute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos", Agia Paraskevi, Athens 15310, Greece, Molecular Genetics, Whitaker Cardiovascular Institute, Departments of Medicine and Biochemistry, Boston University School of Medicine, 700 Albany Street, W509, Boston, Massachusetts 02118, and Department of Basic Sciences, Medical School and Department of Biology, University of Crete, Heraklion 71110, Greece*

Received November 14, 2006; Revised Manuscript Received February 9, 2007

**ABSTRACT:** ATP-binding cassette transporter A-1 (ABCA1)-mediated lipid efflux to lipid-poor apolipoprotein A-I (apoA-I) results in the gradual lipidation of apoA-I. This leads to the formation of discoidal high-density lipoproteins (HDL), which are subsequently converted to spherical HDL by the action of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT). We have investigated the effect of point mutations and deletions in the carboxy-terminal region of apoA-I on the biogenesis of HDL using adenovirus-mediated gene transfer in apoA-I-deficient mice. It was found that the plasma HDL levels were greatly reduced in mice expressing the carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)], shown previously to diminish the ABCA1-mediated lipid efflux. The HDL levels were normal in mice expressing the WT apoA-I, the apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] deletion mutant, or the apoA-I[E191A/H193A/K195A] point mutant, which promote normal ABCA1-mediated lipid efflux. Electron microscopy and two-dimensional gel electrophoresis showed that the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] mutants formed mainly pre $\beta$ -HDL particles and few spherical particles enriched in apoE, while WT apoA-I, apoA-I[ $\Delta$ (232–243)], and apoA-I[E191A/H193A/K195A] formed spherical  $\alpha$ -HDL particles. The findings establish that (a) deletions that eliminate the 220–231 region of apoA-I prevent the synthesis of  $\alpha$ -HDL but allow the synthesis of pre $\beta$ -HDL particles in vivo, (b) the amino-terminal segment 1–184 of apoA-I can promote synthesis of pre $\beta$ -HDL-type particles in an ABCA1-independent process, and (c) the charged residues in the 191–195 region of apoA-I do not influence the biogenesis of HDL.

Apolipoprotein A-I (apoA-I)<sup>1</sup> is the major protein component of high-density lipoproteins (HDL) and plays an essential role in the biogenesis, structure, function, and plasma concentration of HDL (1–5). ApoA-I contains 22- and 11-amino acid repeats (6, 7) which based on earlier X-ray crystallography (8) and computer modeling (7) are organized in amphipathic  $\alpha$ -helices. Most recently, lipid-free apoA-I has been crystallized in salt buffers containing 500  $\mu$ M Cr(III)-Tris-acetylacetonate (Cr-acac3) (9). Under the conditions of crystallization, the protein consists of a four helix amino-terminal bundle and two carboxy-terminal helices.

The biogenesis and catabolism of HDL can be considered as a complex pathway that involves several proteins (5). In the early steps of this pathway, apoA-I is secreted mostly lipid-free by the liver and acquires phospholipid and cholesterol via its interactions with the ATP-binding cassette A1 (ABCA1) lipid transporter (2, 10, 11). Through a series of intermediate steps that are poorly understood, apoA-I is gradually lipidated and proceeds to form discoidal particles that are converted to spherical particles by the action of lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) (3, 12). Both the discoidal and the spherical HDL particles interact functionally with the HDL receptor scavenger receptor class B type I (SR-BI) (4, 13, 14). They also interact with the ABCG1 transporter (15). The late steps of the HDL pathway involve the transfer of cholesteryl esters to very low density lipoprotein/low density lipoprotein (VLDL/LDL) for eventual catabolism by the LDL receptor, the hydrolysis of phospholipids and residual triglycerides by the various lipases (lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase), and the transfer of phospholipids from VLDL/LDL to HDL by the action of phospholipid transfer protein (16).

In previous studies, we used adenovirus-mediated gene transfer of apoA-I mutants to identify steps in the HDL biogenesis pathway where intermediates of the pathway cannot be converted to products and therefore accumulate in plasma (2, 17–20). Discrete phenotypes were observed

<sup>†</sup> This work was supported by the Grant of the 6th Framework Programme of the European Union LSHM-CT-2006-037631 (A.C. and V.I.Z.) and the National Institutes of Health Grant HL-48739 (V.I.Z.).

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +30 210 6503626. Fax: +30 210 6511767. E-mail: achroni@bio.demokritos.gr.

<sup>‡</sup> Institute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos".

<sup>§</sup> Boston University School of Medicine.

<sup>#</sup> University of Crete.

<sup>1</sup> Abbreviations: ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; apoA-I, apolipoprotein A-I; apoA-I<sup>-/-</sup> mice, apoA-I-deficient mice; BSA, bovine serum albumin; CE, cholesteryl ester; cpt-cAMP, 8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3':5'-cyclic monophosphate; Cr-acac3, Cr(III)-Tris-acetylacetonate; EM, electron microscopy; FBS, fetal bovine serum; FPLC, fast protein liquid chromatography; GFP, green fluorescent protein; HDL, high density lipoproteins; LCAT, lecithin:cholesterol acyltransferase; PBS, phosphate-buffered saline; PL, phospholipids; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; WT, wild-type.

Table 1: Oligonucleotide Sequence of Primers Used in PCR Amplifications

name	sequence	location of sequence
185F	5'-CTC AAG GAG AAC <u>TGA</u> <sup>a</sup> GGC GCC AGA CTG-3'	nt 612–638 of apoA-I cDNA <sup>b</sup> (sense) (amino acids +181 to +189)
185R	5'-CAG TCT GGC GCC <u>TCA</u> GTT CTC CTT GAG-3'	nt 638–612 (antisense) (amino acids +189 to +181) <sup>c</sup>
M32S	5'-CTG GCC <u>GCG</u> <sup>d</sup> TAC <u>GCC</u> GCC <u>GCG</u> GCC ACC GAG-3'	nt 638–665 of apoA-I cDNA (sense) (amino acids +189 to +198)
M32A	5'-CTC GGT GGC <u>CGC</u> GGC <u>GGC</u> GTA <u>CGC</u> GGC CAG TCT-3'	nt 665–633 of apoA-I cDNA (antisense) (amino acids +198 to +188)
AINOT F	5' CCT CCG CGG ACA GGC <b>GGC CGC</b> <sup>e</sup> CAG GG 3'	nt 886–911 of apoA-I genomic sequence <sup>f</sup> that contains a NotI site (sense), intron 3 of apoA-I gene
AISAL R	5' A CAT <b>GTC GAC</b> CCC CTT TCA GGG CAC CTG GCC TTG 3'	ACAT + SalI site + nt 1917–1894 of apoA-I genomic sequence (antisense), at 3' end of apoA-I gene

<sup>a</sup> The stop codon is underlined. <sup>b</sup> Nucleotide number of the human apoA-I cDNA sequence (57), oligonucleotide position (+) relative to the translation initiation ATG codon. <sup>c</sup> Amino acid position (+) refers to the mature plasma apoA-I sequence. <sup>d</sup> Mutagenized residues are marked in boldface type and are underlined. <sup>e</sup> The restriction enzyme recognition sites are marked in boldface type. <sup>f</sup> Nucleotide number of the human apoA-I genomic sequence (21), oligonucleotide position (+) relative to the translation initiation ATG codon.

that were characterized by a total lack of HDL synthesis, accumulation of discoidal particles of abnormal pre $\beta$ - $\alpha$ -HDL ratios, and various forms of dyslipidemias (2, 17–20).

In the present study, we analyzed the impact of carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[ $\Delta$ (185–243)], apoA-I[ $\Delta$ (220–243)], and apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] as well as the impact of the point mutant apoA-I[E191A/H193A/K195A] on the biogenesis of HDL in vivo using adenovirus-mediated gene transfer of apoA-I mutants in apoA-I-deficient (apoA-I<sup>-/-</sup>) mice. The formation of HDL was assessed by fast protein liquid chromatography (FPLC) fractionation, electron microscopy (EM) analysis, and two-dimensional gel electrophoresis of plasma.

Our findings indicated that carboxy-terminal deletions that remove the 220–231 region of apoA-I prevent the biogenesis of normal  $\alpha$ -HDL particles but allow the formation of pre $\beta$ -HDL particles by processes, which appear to be independent of apoA-I/ABCA1 interactions.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials.** Materials not mentioned in the experimental procedures have been obtained from sources described previously (2, 17).

**Generation of Adenoviruses Expressing the Wild-Type (WT) and the Mutant apoA-I Forms.** The construction of recombinant adenoviruses carrying the genomic sequence for the WT apoA-I, apoA-I[ $\Delta$ (220–243)], and apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] has been described before (2, 19). The adenoviruses expressing apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[E191A/H193A/K195A] were generated in a similar way. Briefly, the fourth exon of the human apoA-I gene was amplified and mutagenized by polymerase chain reaction, using a set of specific mutagenic primers (185F and 185R for apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and M32S and M32A for apoA-I[E191A/H193A/K195A]) containing the mutation of interest and a set of flanking universal primers (AINOTF and AISALR) containing the restriction sites *NotI* and *SalI*. The sequences of the primers are shown in Table 1. The pCA13A1gN vector, which contains a *NotI* site in intron 3 and an *XhoI* site in the 3'-end of the apoA-I gene, was used as a template in the amplification reactions (19, 21). The DNA fragment containing the mutation of interest was digested with *NotI* and *SalI* and subcloned into the *NotI* and *XhoI* sites of the pCA13A1gN vector, thus replacing the WT with the mutated exon 4 sequence. The pCA13-A-I plasmids, containing the 185–

243 deletion or the E191A/H193A/K195A point mutation, along with a helper PJM17 adenovirus plasmid, were used to generate recombinant adenoviruses as described previously (17, 19).

**Animal Studies, Plasma Lipids, apoA-I and apoA-I mRNA Levels Analyses.** ApoA-I<sup>-/-</sup> (apoA-I<sup>tm1Unc</sup>) C57BL/6J mice (22) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). The mice were maintained on a 12-h light/dark cycle and standard rodent chow. All procedures performed on the mice were in accordance with National Institutes of Health and institutional guidelines. ApoA-I<sup>-/-</sup> mice, 6–8 weeks of age, were injected via the tail vein with  $1 \times 10^9$  pfu of recombinant adenovirus per animal, and the animals were sacrificed 4 days postinjection following a 4-h fast.

The concentration of total cholesterol, free cholesterol, phospholipids, and triglycerides of plasma drawn 4 days post-infection was determined using the Cholesterol CII, Free Cholesterol C, Phospholipids B (Wako Chemicals USA, Inc.) and INFINITY triglycerides (ThermoDMA) reagents, respectively, according to the manufacturer's instructions. The concentration of cholesteryl esters was determined by subtracting the concentration of free cholesterol from the concentration of total cholesterol. Plasma apoA-I levels were measured by turbidimetric immunoassay using the Autokit Apo A1 reagents (Wako Chemicals USA, Inc.), according to the manufacturer's instructions. Hepatic human apoA-I mRNA levels were determined by Northern blotting as described (2, 4).

For FPLC analysis of plasma, 17  $\mu$ L plasma obtained from mice infected with adenovirus-expressing WT or mutant apoA-I forms were loaded onto a Sepharose 6 PC column (Amersham Biosciences) in a SMART micro FPLC system (Amersham Biosciences) and eluted with phosphate-buffered saline (PBS). A total of 25 fractions of 50  $\mu$ L volume each were collected for further analyses. The concentration of lipids and apoA-I in the FPLC fractions was determined as described above.

**Fractionation of Plasma by Density Gradient Ultracentrifugation and Electron Microscopy Analysis of the apoA-I-Containing Fractions.** For this analysis, 300  $\mu$ L of plasma obtained from adenovirus-infected mice was diluted with saline to a total volume of 0.5 mL. The mixture was adjusted to a density of 1.23 g/mL with KBr and overlaid with 1 mL of KBr solution of  $d = 1.21$  g/mL, 2.5 mL of KBr solution of  $d = 1.063$  g/mL, 0.5 mL of KBr solution of  $d = 1.019$

g/mL, and 0.5 mL of normal saline. The mixture was centrifuged for 22 h in SW55 rotor at 30 000 rpm. Following ultracentrifugation, 0.5 mL fractions were collected from the top for further analyses. The refractive index of the fractions was measured using a refractometer (American Optical Corp.), and it was converted to density for each sample based on a standard curve derived from solutions of known densities. The fractions were dialyzed against ammonium acetate and carbonate buffer (126 mM ammonium acetate, 2.6 mM ammonium carbonate, 0.26 mM EDTA, pH 7.4). Aliquots of the fractions were subjected to SDS-PAGE, and the protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue. The fractions that were obtained from the plasma of mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] mutants were further analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The nitrocellulose membranes were probed with goat polyclonal anti-human apoA-I antibody (Chemicon International) and/or goat polyclonal anti-mouse apoE antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

For EM analysis, fractions 6–8 that float in the HDL region were dialyzed against ammonium acetate and carbonate buffer. The samples were applied on carbon-coated grids, were stained with sodium phosphotungstate, were visualized in the Phillips CM-120 electron microscope (Phillips Electron Optics, Eindhoven, Netherlands) and photographed as described previously (2). The photomicrographs were taken at 75000 $\times$  magnification and enlarged three times.

**Nondenaturing Two-Dimensional Electrophoresis.** The distribution of HDL subfractions in plasma was analyzed by two-dimensional electrophoresis as described (23) with some modifications. Briefly, in the first dimension, 1  $\mu$ L of plasma sample was separated by electrophoresis at 4  $^{\circ}$ C in a 0.75% agarose gel using a 50 mM barbital buffer (pH 8.6, Sigma, St. Louis, MO) until the bromophenol blue marker had migrated 5.5 cm. Agarose gel strips containing the separated lipoproteins were then transferred to a 4–20% polyacrylamide gradient gel. Separation in the second dimension was performed at 90 V for 2–3 h at 4  $^{\circ}$ C. The separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane, and human apoA-I and mouse apoE were detected by using a goat polyclonal anti-human apoA-I antibody (Chemicon International) and a goat polyclonal anti-mouse apoE antibody (Santa Cruz Biotechnology), respectively.

**Agarose Gel Electrophoresis.** Pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL were separated by 0.7% agarose gel electrophoresis followed by Oil Red O neutral lipid staining (Sigma, St. Louis, MO) according to manufacturer's instructions or Western blotting using a goat polyclonal anti-human apoA-I antibody (Chemicon International).

**Cell Secretion of WT and Mutant apoA-I Forms.** For assessing the secretion of WT and mutant apoA-I forms, human HTB13 cells (SW 1783, human astrocytoma) grown to 80% confluence in Leibovitz's L-15 medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) in 100-mm diameter dishes were infected with adenoviruses expressing WT and mutant apoA-I forms at a multiplicity of infection of 20. Twenty-four hours post-infection, the cells were washed twice with PBS and preincubated in serum-free medium for 2 h. Following an additional wash with PBS, fresh serum-free medium was added. After 24 h of incubation, medium

was collected and analyzed by SDS-PAGE for apoA-I expression. HTB-13 cells have been chosen in these experiments and for large-scale growing in roller bottles because they produce higher yields of apoA-I as compared to Chinese hamster ovary cells (CHO) and C127 mouse mammary tumor carcinoma cells (ATCC CRC1616).

**Cholesterol Efflux Assay.** ABCA1-dependent efflux of [ $^3$ H]-cholesterol to lipid-free apoA-I acceptor was measured using J774 macrophages in which expression of ABCA1 was induced by a cAMP analogue, as described previously (2). The apoA-I forms used as cholesterol acceptors were produced by infection of HTB-13 cells grown in large scale in roller bottles and purification of apoA-I followed as described (3). On day 0 J774 macrophages were plated in 12-well plates at density of  $5 \times 10^5$  cells/well in RPMI 1640 with 10% (v/v) FBS and antibiotics. On day 1 cells were labeled with 1 mL of labeling medium (6  $\mu$ Ci/mL 1,2-[ $^3$ H]-cholesterol) for 24 h. Following 24 h of labeling and washing, cells were treated with serum-free medium and equilibrated for 24 h with or without 0.3 mM 8-(4-chlorophenylthio)-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cpt-cAMP). At the end of the treatment period with cpt-cAMP, cells were washed twice and incubated with 1 mL of RPMI 1640, supplemented with 0.2% (w/v) bovine serum albumin (BSA), with or without 1  $\mu$ M WT apoA-I or mutant forms at 37  $^{\circ}$ C. At different time points up to 6 h, 55  $\mu$ L of medium were collected and clarified by centrifugation in a microcentrifuge for 2 min. The radioactivity in 40  $\mu$ L of the supernatant was determined by liquid scintillation counting. At the end of the incubation, cells were lysed by 800  $\mu$ L of lysis buffer (PBS containing 1% (v/v) Triton X-100) for 30 min at room temperature, and radioactivity was measured in 40  $\mu$ L of cell lysate. The percentage of secreted [ $^3$ H]cholesterol was calculated by dividing the medium-derived counts by the sum of the total counts present in the culture medium and the cell lysate. To calculate the net cpt-cAMP-dependent efflux, the cholesterol efflux of the untreated cells was subtracted from the cholesterol efflux of the cells treated with cpt-cAMP. The total and net cpt-cAMP-dependent efflux of cholesterol was linear over a 4-h period and was defined as 100%.

## RESULTS

**In Vitro Studies: ABCA1-Mediated Efflux of Cellular Cholesterol.** The overall objective of these studies was to assess the importance of domains and residues of the carboxy-terminal region of apoA-I in the ABCA1-mediated lipid efflux and the biogenesis of HDL following the expression of these mutants in apoA-I $^{-/-}$  mice.

On the basis of the three-dimensional structure of apoA-I, the amino-terminal four helix bundle of apoA-I is connected with a loop, consisting of amino acids 188–195, to the two carboxy-terminal helices of apoA-I (9). Previous studies have shown that the carboxy-terminal region of apoA-I is involved in binding to multilamellar phospholipid particles and to HDL particles (3). We have shown previously that the ABCA1-mediated cholesterol efflux to the carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] or apoA-I[ $\Delta$ (220–243)], which lack the 220–231 region, was reduced to 20 and 9% of WT control, respectively (2). However, the ABCA1-mediated cholesterol efflux to the carboxy-terminal

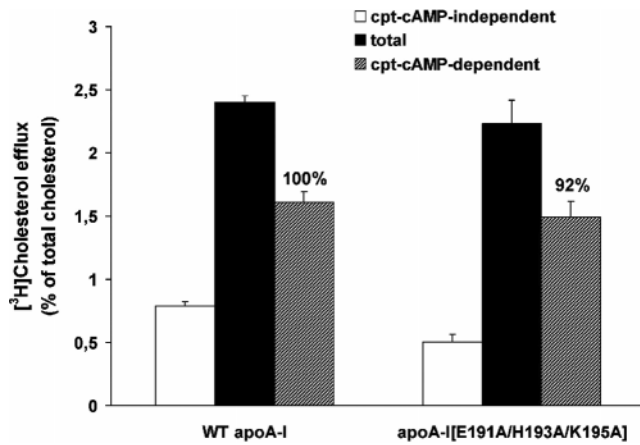


FIGURE 1: ABCA1-mediated cholesterol efflux in the presence of WT apoA-I and apoA-I[E191A/H193A/K195A]. Cells labeled with 6  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  [ $^3\text{H}$ ]cholesterol for 24 h and treated with or without 0.3 mM cpt-cAMP for 24 h were incubated with 1  $\mu\text{M}$  WT apoA-I and apoA-I[E191A/H193A/K195A] for 4 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Media and cells were collected separately, and the radioactivity was measured as described in Experimental Procedures. The percent of [ $^3\text{H}$ ]cholesterol efflux represents the amount of the radioactivity released in the medium divided by the total radioactivity present in the culture medium and the cell lysate. The percent of the net cpt-cAMP-dependent [ $^3\text{H}$ ]cholesterol efflux was calculated as the difference in percent of cholesterol efflux between treated cells (total efflux) and untreated cells (cpt-cAMP independent efflux). Black and white bars show the percent of [ $^3\text{H}$ ]cholesterol efflux from cpt-cAMP treated and untreated cells, respectively. Shaded bars show the percent of the net cpt-cAMP-dependent [ $^3\text{H}$ ]cholesterol efflux. The numbers on top of the bars represent the cholesterol efflux relative to the WT control set to 100%. Values are the means  $\pm$  S.D. from three independent experiments performed in duplicate.

deletion mutant apoA-I[ $\Delta(232-243)$ ], which retains the 220–231 region, was normal (2).

In the current study, we showed that the cpt-cAMP-dependent (ABCA1-mediated) cholesterol efflux in the presence of apoA-I[E191A/H193A/K195A] acceptor was 92% of the WT control (Figure 1).

**In Vivo Studies: Plasma Lipids and apoA-I Levels and Hepatic apoA-I mRNA Levels following Adenovirus Mediated-Gene Transfer in apoA-I $^{-/-}$  Mice.** To determine the effect of the carboxy-terminal deletions  $\Delta(185-243)$ ,  $\Delta(220-243)$ , and  $\Delta(232-243)$  and the point mutation E191A/H193A/K195A in apoA-I on the biogenesis of HDL, we used adenovirus-mediated gene transfer of apoA-I mutants in apoA-I $^{-/-}$  mice. For a typical experiment, 4–7 mice were injected with  $1 \times 10^9$  pfu of recombinant adenoviruses expressing the WT or the mutants apoA-I forms or of the control adenovirus expressing green fluorescent protein (GFP). Plasma samples and the liver of mice were collected 4 days post-infection.

Analysis of plasma lipids and apoA-I levels, and hepatic apoA-I mRNA levels showed that apoA-I $^{-/-}$  mice infected with adenoviruses expressing the carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[ $\Delta(185-243)$ ] or apoA-I[ $\Delta(220-243)$ ] and apoA-I $^{-/-}$  mice infected with the control adenovirus expressing the green fluorescent protein (apoA-I $^{-/-}$  GFP) had reduced levels of total and esterified cholesterol and decreased cholesteryl ester/total cholesterol (CE/TC) ratio. In contrast, the apoA-I $^{-/-}$  mice infected with adenoviruses expressing the WT apoA-I, the carboxy-terminal deletion mutant apoA-I[ $\Delta(232-243)$ ], and the carboxy-terminal point

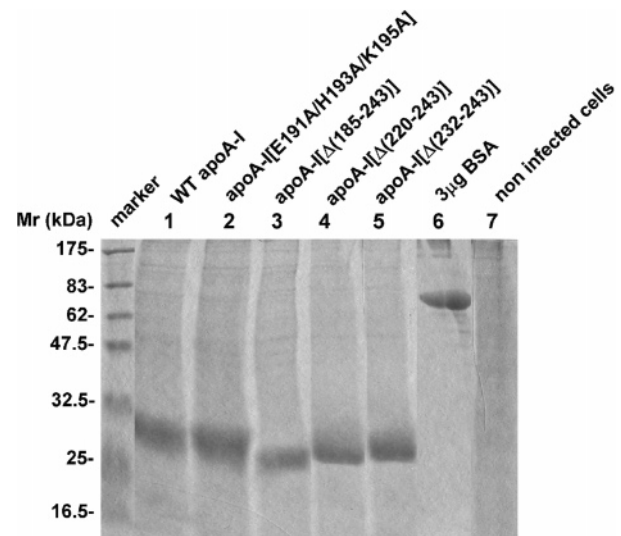


FIGURE 2: Expression of WT and mutant apoA-I forms in cultures of HTB-13 cells following infection with the corresponding recombinant adenoviruses. SDS-PAGE analysis of medium obtained from HTB-13 cells grown in 100-mm dishes and infected with adenoviruses expressing the WT and mutant apoA-I forms as described in the Experimental Procedures. An aliquot of 30  $\mu\text{L}$  of serum-free culture medium was analyzed. “Marker” indicates protein markers of different molecular mass, as shown in the figure. Lane 6 contains 3  $\mu\text{g}$  of BSA. It was estimated that the infected cultures ( $5 \times 10^6$  cells) secreted approximately 60–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  WT and mutant apoA-I forms over 24 h of incubation.

mutant apoA-I[E191A/H193A/K195A] had normal levels of total and esterified cholesterol and similar CE/TC ratios (Table 2). The phospholipid levels were normal in mice expressing the WT apoA-I and the apoA-I[ $\Delta(232-243)$ ] and apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants but were greatly reduced in mice expressing the apoA-I[ $\Delta(185-243)$ ] or apoA-I[ $\Delta(220-243)$ ] mutants as well as in the control mice that express GFP (Table 2). The plasma triglycerides in mice expressing the WT or mutant apoA-I forms were moderately increased as compared to apoA-I $^{-/-}$  mice expressing GFP but remained within the normal range (Table 2). The plasma apoA-I levels in mice expressing the apoA-I[ $\Delta(232-243)$ ] and apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants were 40 and 85% of the levels in mice expressing the WT apoA-I, respectively. In contrast, the plasma apoA-I levels were greatly reduced in mice expressing the apoA-I[ $\Delta(220-243)$ ] mutant and were diminished in mice expressing the apoA-I[ $\Delta(185-243)$ ] mutant (Table 2). The differences in plasma lipid and apoA-I levels do not reflect differences in apoA-I expression since the relative amounts of apoA-I mRNA were comparable (Table 2). In addition, the WT and all apoA-I mutant forms were secreted with the same efficiency into the medium of HTB-13 cells following infection with adenoviruses expressing the WT and mutant apoA-I forms (Figure 2). As seen in Figure 2, the noninfected HTB-13 cells do not synthesize apoA-I.

**FPLC Profiles of Plasma Isolated from Mice Infected with Adenoviruses Expressing the WT or the Mutant apoA-I Forms.** FPLC analysis of plasma from apoA-I $^{-/-}$  mice infected with recombinant adenoviruses expressing the apoA-I[ $\Delta(185-243)$ ] or apoA-I[ $\Delta(220-243)$ ] mutants showed that small amounts of cholesterol and phospholipids were detected in the HDL region (Figure 3A,B). The cholesterol and phospholipid distribution and levels in these mice were

Table 2: Comparison of Plasma Lipids and apoA-I Levels and Hepatic mRNA Levels of apoA-I<sup>-/-</sup> Mice 4 days Post-infection with Recombinant Adenoviruses Expressing the WT apoA-I or apoA-I Mutants or the Control Protein GFP<sup>a</sup>

	total cholesterol (mg/dL)	free cholesterol (mg/dL)	cholesteryl esters (mg/dL)	CE/TC	phospholipids (mg/dL)	triglycerides (mg/dL)	apoA-I (mg/dL)	relative apoA-I mRNA (%)
WT apoA-I	116 ± 33	36 ± 18	81 ± 18	0.71 ± 0.08	273 ± 52	91 ± 6	216 ± 36	100
apoA-I[ $\Delta$ (185–243)]	28 ± 3	23 ± 2	5 ± 2	0.17 ± 0.07	69 ± 7	53 ± 13	0.8 ± 0.1	94 ± 17
apoA-I[ $\Delta$ (220–243)]	43 ± 4	24 ± 1	18 ± 3	0.42 ± 0.03	52 ± 6	51 ± 13	13 ± 3	96 ± 2
apoA-I[ $\Delta$ (232–243)]	79 ± 17	20 ± 5	59 ± 12	0.75 ± 0.03	142 ± 24	68 ± 8	87 ± 25	100 ± 20
apoA-I[E191A/ H193A/K195A]	113 ± 11	30 ± 3	83 ± 9	0.73 ± 0.03	241 ± 35	81 ± 30	183 ± 32	82 ± 13
apoA-I <sup>-/-</sup> GFP	27 ± 4	13 ± 3	14 ± 6	0.53 ± 0.09	94 ± 13	37 ± 9		

<sup>a</sup> Values are means ± SD ( $n = 4-7$ ).

comparable to those of mice infected with the control adenovirus expressing the GFP (Figure 3A,B). Small amounts of apoA-I were also found in the HDL region in mice infected with the adenovirus expressing the apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] mutant, and barely detectable amounts of apoA-I were found in the HDL region in mice infected with the adenovirus expressing the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] mutant (Figure 3D). The plasma cholesterol, phospholipids, and apoA-I in mice expressing the WT apoA-I, apoA-I[ $\Delta$ (232–243)], or apoA-I[E191A/H193A/K195A] were distributed in the HDL region (Figure 3A,B,D). The cholesterol, phospholipids, and apoA-I FPLC profiles of mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] mutant also had a small shoulder at the LDL region (Figure 3A,B,D). The cholesteryl ester profiles in these mice were identical to those of total cholesterol (data not shown). In all mice infected with the recombinant adenoviruses, the plasma triglycerides were distributed in the VLDL region (Figure 3C).

The fractions 14–24, which correspond to the HDL region, obtained from mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] had an increased molar ratio of phospholipids/apoA-I compared to that of fractions 14–24 obtained from mice expressing the WT apoA-I (67.2-fold increase) (Figure 3E). An increase in the molar ratio of phospholipids/apoA-I of fractions 14–24 obtained from mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] as compared to mice expressing WT apoA-I (4-fold) was also observed, but this increase was less pronounced than that observed for apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] (Figure 3E). In a previous study, it was observed that the HDL isolated by FPLC from ABCA1-deficient mice also had an increased molar ratio of phospholipids/apoA-I compared to HDL isolated from control mice (11-fold increase) (24).

Furthermore, based on the lipid composition, it was observed an increased percentage of triglycerides in fractions 14–24 obtained from mice expressing apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] (4- and 3-fold increase, respectively) (Figure 3E). An increased percentage of triglycerides (40-fold increase) was also observed in the HDL isolated from ABCA1-deficient mice (24).

*Effect of the Carboxy-Terminal Mutations on the Distribution of apoA-I in Different Densities and the Composition of HDL.* The fractions obtained following density gradient ultracentrifugation of the plasma of mice expressing the WT or the mutant apoA-I forms or the control protein GFP were analyzed by SDS-PAGE, and the protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue. This analysis showed that in mice infected with adenoviruses expressing the WT apoA-I, the apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] and the

apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants, apoA-I was distributed in the HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> region (Figure 4A,D,E). In mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] mutant, there was a shift in the distribution of apoA-I toward the HDL<sub>3</sub> region (Figure 4D). In mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] mutant, the low levels of apoA-I were detected in HDL<sub>2</sub>, HDL<sub>3</sub>, and the  $d > 1.21$  g/mL fractions (Figure 4C). The majority of apoA-I was found in the HDL<sub>3</sub> and the lipid-poor fractions. In mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] mutant, apoA-I could not be detected by Coomassie Brilliant Blue staining (Figure 4B). Western blotting showed that the majority of apoA-I was found in the  $d > 1.21$  g/mL fractions, and small quantities were in the HDL<sub>3</sub> region (Figure 4G). The low levels of apoA-I detected by SDS-PAGE analysis of the density gradient ultracentrifugation fractions for the carboxy-terminal mutants are consistent with the low plasma apoA-I levels detected by turbidimetric immunoassay (Table 2). In mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] carboxy-terminal deletion mutants, the apoE levels were increased and apoE was distributed in the HDL<sub>2</sub> region (Figure 4B,C). The apoE levels and distribution in these mice were similar to those observed in mice infected with the control adenovirus that expresses GFP (Figure 4F). The HDL fraction of apoA-I<sup>-/-</sup> mice was shown previously to contain mainly apoE, as well as apoA-IV, apoA-II, and apoCs (25).

Analysis of the distribution of total cholesterol, cholesteryl ester, free cholesterol, triglycerides, and phospholipids following density gradient ultracentrifugation of plasma essentially confirmed the distribution of these lipids to different lipoprotein fractions that were obtained by FPLC fractionation (data not shown). The CE/TC ratio was calculated in fractions 4–8 that correspond to the HDL region (Figure 4A–F). This analysis showed that the CE/TC ratio in mice infected with the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] carboxy-terminal deletion mutants was lower than that of the mice infected with the GFP-expressing adenovirus and was greatly reduced as compared to the CE/TC ratio of mice infected with adenoviruses expressing the WT apoA-I or the apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] and the apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants (Figure 4A–F). Similar information for the CE/TC ratio of the HDL region for the WT and mutant apoA-I forms was obtained by analysis of the FPLC fractions (data not shown).

Consistent with the lipid composition of the FPLC fractions that correspond to the HDL region, the fractions 4–8 obtained by density gradient ultracentrifugation that also correspond to the HDL region had increased molar ratio of

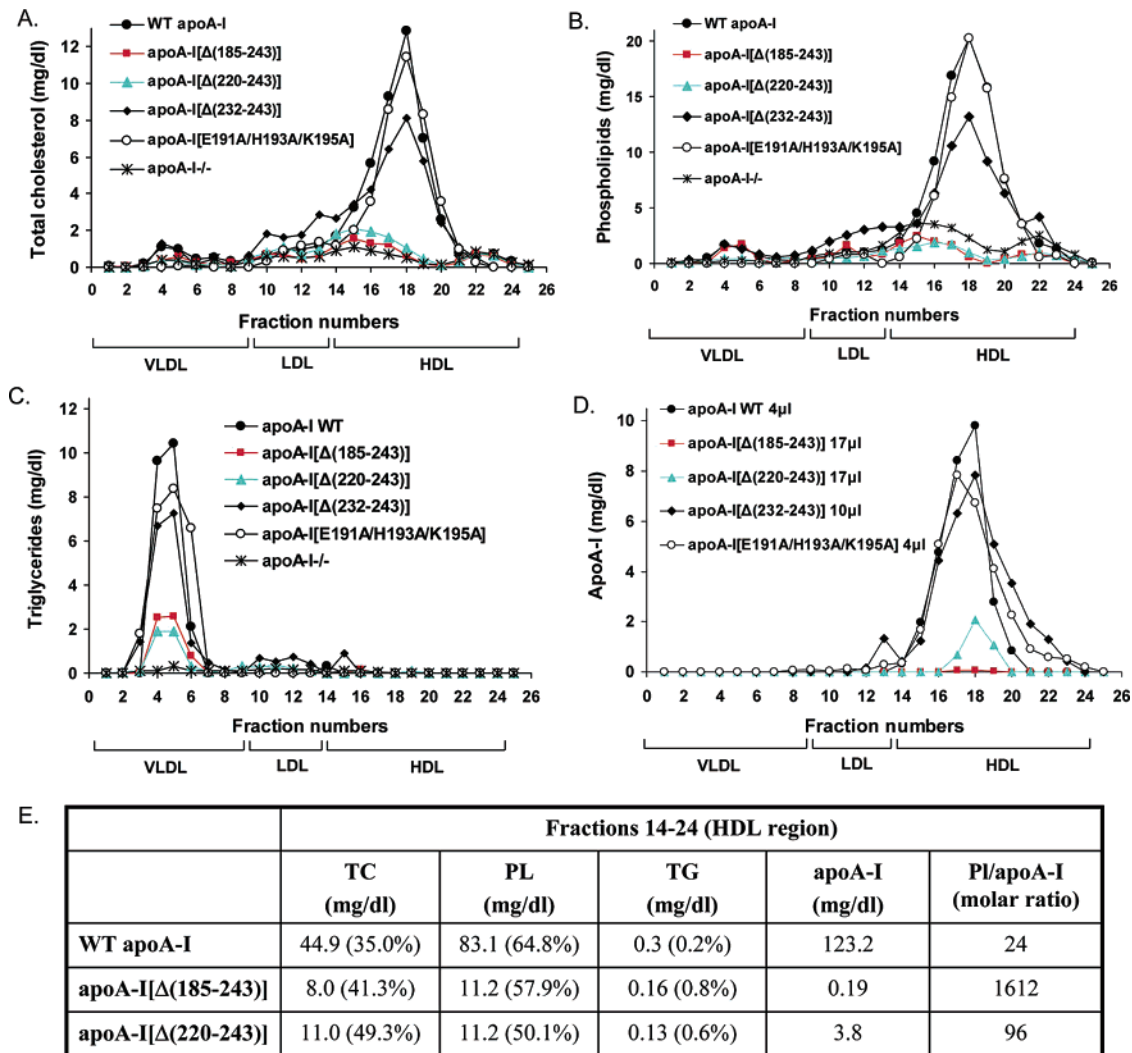


FIGURE 3: FPLC profiles of total cholesterol, phospholipids, triglycerides, and apoA-I in plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the WT apoA-I or the carboxy-terminal mutants apoA-I[Δ(185–243)], apoA-I[Δ(220–243)], apoA-I[Δ(232–243)], apoA-I[E191A/H193A/K195A] or the control protein GFP. Plasma samples were obtained from mice infected with  $1 \times 10^9$  pfu of the recombinant adenoviruses expressing the WT or mutant forms of apoA-I or the control protein GFP 4 days post-infection. The samples were fractionated by FPLC and then the total cholesterol (A), phospholipids (B), triglycerides (C), and apoA-I (D) levels of each FPLC fraction were determined as described in Experimental Procedures. Panel E, Lipids and apoA-I concentrations from a pool of lipoprotein fractions that correspond to the HDL region (fractions 14–24) expressed as mg/dL. TG, triglycerides; PL, phospholipids; TC, total cholesterol; %, percentage composition expressed relatively to the sum of TG, PL, and TC values. PL/apoA-I is expressed as molar ratio.

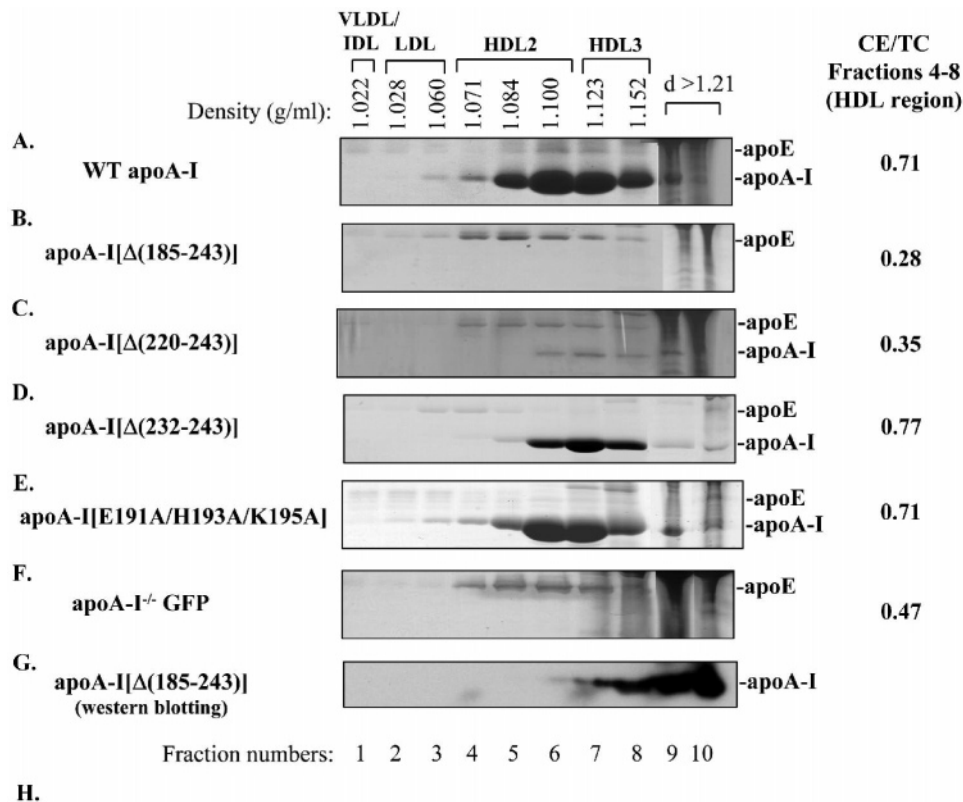
phospholipids/apoA-I (57.5-fold increase) and had an increased percentage of triglycerides (4.3-fold increase) in mice expressing the apoA-I[Δ(185–243)] compared to fractions 4–8 obtained from mice expressing the WT apoA-I (Figure 4H). A less pronounced increase in the molar ratio of phospholipids/apoA-I (2.1-fold) and the percentage of triglycerides (3.7-fold) was observed for fractions 4–8 obtained from mice expressing the apoA-I[Δ(220–243)] as compared to mice expressing the WT apoA-I (Figure 4H).

**Effect of the Carboxy-Terminal Mutations on the Formation of HDL.** Analysis by EM of the HDL fractions 6 and 7 (density 1.100–1.123 g/mL), obtained by density gradient ultracentrifugation (Figure 4A–F), showed that the mice expressing the WT apoA-I and the apoA-I[Δ(232–243)] and apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants formed a large number of spherical HDL particles (Figure 5A,D,E). In contrast the HDL fraction of mice expressing the apoA-I[Δ(185–243)] and apoA-I[Δ(220–243)] mutants contained few spherical particles (Figure 5B,C) similar to those seen in control mice infected with the adenovirus expressing

GFP (Figure 5F). Similar results were obtained by EM analysis of fraction 8, whereas analysis of  $d > 1.21$  g/mL fractions did not show the presence of any particles (data not shown).

The HDL fractions 6 and 7 from mice expressing the WT apoA-I or the carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[Δ(185–243)] and apoA-I[Δ(220–243)] or the control protein GFP were also analyzed by SDS–PAGE and Western blotting using an anti-mouse apoE antibody. It was found that the apoE levels in the HDL fractions of mice expressing the apoA-I[Δ(185–243)] and apoA-I[Δ(220–243)] mutants, as well as in apoA-I<sup>-/-</sup> mice infected with the adenovirus-expressing GFP, were increased compared to the HDL fractions of mice expressing the WT apoA-I (Figure 5G). It has been previously shown that the levels of mouse apoE in plasma as well as in the HDL fraction of apoA-I<sup>-/-</sup> mice are high and are reduced by expression of WT apoA-I in these mice (25–27).

*The Carboxy-Terminal Deletions Inhibit the Formation of α-HDL Particles, But Can Promote the Formation of preβ-*



	Fractions 4-8 (HDL region)				
	TC (mg/dl)	PL (mg/dl)	TG (mg/dl)	apoA-I (mg/dl)	PL/apoA-I (molar ratio)
WT apoA-I	34.2 (26.4%)	85.4 (66%)	9.8 (7.6%)	130	24
apoA-I[Δ(185-243)]	6.5 (24.9%)	11.1 (42.5%)	8.5 (32.6%)	0.22	1380
apoA-I[Δ(220-243)]	11.8 (38.2%)	10.4 (33.7%)	8.7 (28.1%)	6.7	51

FIGURE 4: SDS-PAGE analysis of density gradient ultracentrifugation fractions of plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the WT or mutant forms of apoA-I or the control protein GFP. Fractionation of plasma was performed as described in Experimental Procedures. The fractions that were obtained from the plasma of mice expressing the WT apoA-I (A) or the carboxy-terminal mutants apoA-I[Δ(185-243)] (B), apoA-I[Δ(220-243)] (C), apoA-I[Δ(232-243)] (D), apoA-I[E191A/H193A/K195A] (E), or the control protein GFP (F) were subjected to SDS-PAGE, and the protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue. On the right side of panels A-F is shown the CE/TC ratio from a pool of lipoprotein fractions that correspond to the HDL region (fractions 4-8). The fractions that were obtained from the plasma of mice expressing the apoA-I[Δ(185-243)] were further analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using an anti-human apoA-I antibody (G) as described in Experimental Procedures. The densities of the fractions are indicated on the top of the figure. Panel H: Lipids and apoA-I concentrations from a pool of lipoprotein fractions that correspond to the HDL region (fractions 4-8) expressed as mg/dL. TG, triglycerides; PL, phospholipids; TC, total cholesterol; %, percentage composition expressed relatively to the sum of TG, PL, and TC values. PL/apoA-I is expressed as molar ratio.

**HDL Particles.** Two-dimensional gel electrophoresis of plasma showed that the WT apoA-I and the apoA-I[Δ(232-243)] and apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants formed  $\alpha$ -HDL particles and small amounts of pre $\beta$ -HDL particles (Figure 6A,J,K). In contrast, the apoA-I[Δ(185-243)] mutant formed only pre $\beta$ -HDL particles, and the apoA-I[Δ(220-243)] formed pre $\beta$ -HDL particles and a very small amount of  $\alpha$ -HDL particles (Figure 6D,G). When duplicate blots corresponding to those shown in Figure 6A,D,G,J,K were treated with anti-mouse apoE antibodies, apoE-containing lipoproteins with fast electrophoretic mobility and larger size were detected in the plasma of apoA-I-deficient mice infected with adenoviruses expressing the control protein GFP and those expressing the carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[Δ(185-243)], apoA-I[Δ(220-243)] (Figure 6C, E, H). ApoE was not detected in the plasma of mice expressing

the WT apoA-I (Figure 6B), as well as those expressing the apoA-I[Δ(232-243)] or the apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants (data not shown). Figure 6F,I shows the overlapping of Figures 6D,E and Figures 6G,H, respectively, to establish the relative positions of the apoA-I- and apoE-containing lipoprotein particles. These observations are consistent with previous findings that showed increased apoE in the HDL fraction of apoA-I<sup>-/-</sup> mice (25) and decreased apoE in the HDL fraction of WT apoA-I overexpressing mice (26, 27). The increase in apoE levels in mice expressing the apoA-I[Δ(185-243)] and apoA-I[Δ(220-243)] carboxy-terminal deletion mutants may explain the small number of spherical HDL particles observed in the HDL fraction of these mice as well as of apoA-I<sup>-/-</sup> mice (Figure 5B,C,F).

The formation or lack of formation of pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL in mice expressing the WT apoA-I or the apoA-I[Δ(185-



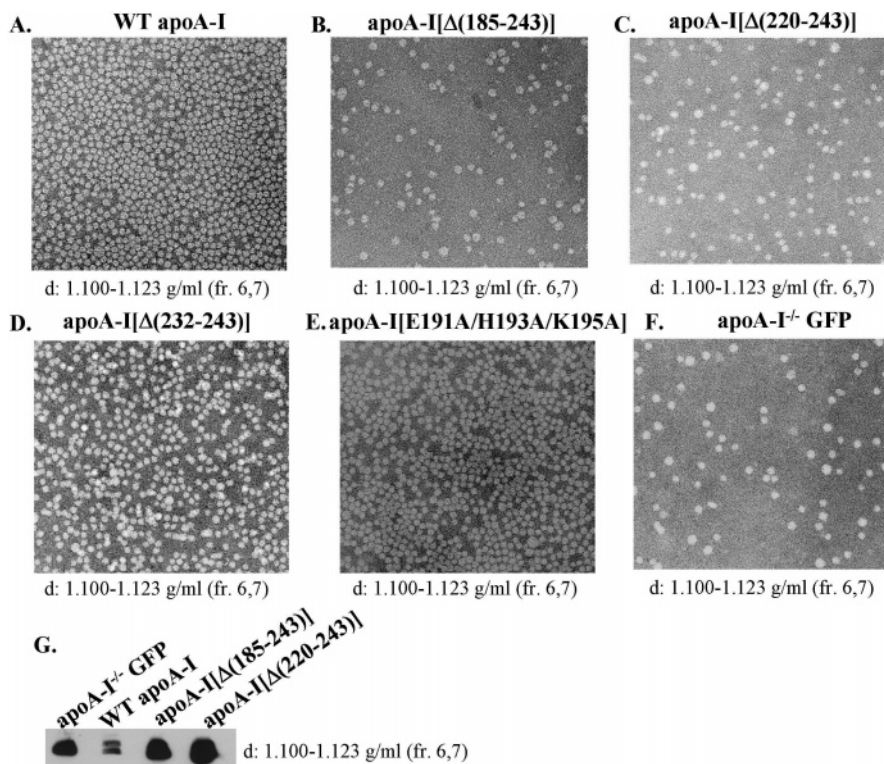


FIGURE 5: Electron microscopy pictures of the fractions corresponding to the HDL region obtained from the plasma of apoA-I<sup>-/-</sup> mice expressing the WT or mutant forms of apoA-I or the control protein GFP. Following density gradient ultracentrifugation the fractions that float to the HDL region obtained from the plasma of mice expressing the WT apoA-I (A) or the carboxy-terminal mutants apoA-I[Δ(185–243)] (B), apoA-I[Δ(220–243)] (C), apoA-I[Δ(232–243)] (D), apoA-I[E191A/H193A/K195A] (E) or the control protein GFP (F) were analyzed by EM. The densities of the fractions used are indicated on the bottom of each picture. The photomicrographs were taken at 75000 $\times$  magnification and enlarged 3 times. The fractions that float to the HDL from mice expressing the WT apoA-I or the carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[Δ(185–243)], apoA-I[Δ(220–243)], or the control protein GFP were also analyzed by SDS–PAGE and Western blotting using an anti-mouse apoE antibody (G).

243]] mutant was evaluated by agarose gel electrophoresis (Figure 6L). HDL was visualized either by Oil Red O neutral lipid staining or Western blot analysis and detection with an anti-human apoA-I polyclonal antibody. The expression of WT apoA-I was associated with  $\alpha$ -migrating and pre $\beta$ -migrating HDL bands that were detected by with neutral lipid staining. These bands, indicated by an asterisk, corresponded to the position of WT apoA-I as determined by immunoblotting (Figure 6L). Oil Red O-stained bands also appear that migrated in the region between pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL, which did not correspond to an apoA-I immunoreactive band. The apoA-I[Δ(185–243)] mutant gave a band that had faster electrophoretic mobility than pre $\beta$ -HDL of WT apoA-I. This band, indicated by an arrow, could be stained with Oil Red O and corresponded to the position of apoA-I[Δ(185–24)] as determined by immunoblotting (Figure 6L). Another band of faster electrophoretic mobility was detected by Oil Red O staining which did not correspond to an apoA-I immunoreactive band. In addition, the purified apoA-I[Δ(185–243)] was not stained with Oil Red O and had a faster electrophoretic mobility compared to the pre $\beta$  band containing apoA-I[Δ(185–243)] that was present in the plasma of mice expressing this mutant and was stained by Oil Red O (indicated by an arrow) (Figure 6L).

## DISCUSSION

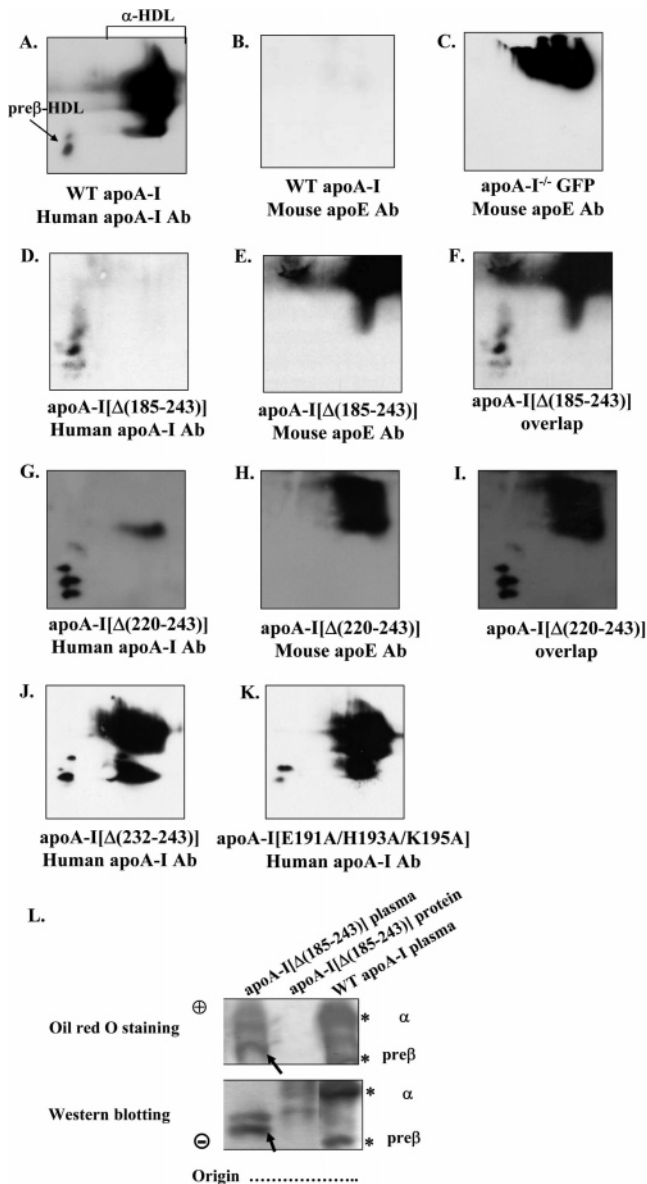
*Role of Specific Domains and Residues of the Carboxy-Terminal Region of apoA-I in the Biogenesis of HDL.* Previous *in vitro* studies showed that the carboxy-terminal

apoA-I deletions that remove the 220–231 region diminished the ABCA1-mediated lipid efflux, whereas the carboxy-terminal (232–243) deletion that retains the 220–231 region does not affect the ABCA1-mediated lipid efflux (2). Chemical cross-linking/immunoprecipitation studies showed that the carboxy-terminal apoA-I deletions that remove the 220–231 region also had a diminished ability to be cross-linked to ABCA1 (28).

In this and previous studies, we considered HDL biogenesis as a continuous pathway where apoA-I and various participating proteins interact successively to form spherical HDL particles that are biologically active. Prerequisite for the biogenesis of HDL are functional interactions between apoA-I and ABCA1 that promote efflux of cellular phospholipids and cholesterol (2, 10, 11). Human patients or animal models that lack apoA-I or ABCA1 or have defective forms of ABCA1 fail to form HDL (11, 22, 29).

Studies in HeLa cells expressing an ABCA1 green fluorescence fusion protein (30, 31) and in macrophages (32, 33) indicated that, following interaction at the cell surface, the apoA-I/ABCA1 complex internalizes, interacts with intracellular lipid pools, and is re-secreted as a lipidated particle (32, 33). Following a similar pathway, apoA-I is transcytosed through endothelial cells and is secreted from the apical surface in a lipid-bound form (34).

Recent data indicate that ABCA1/apoA-I interactions in the liver are essential for the initial lipidation of apoA-I and also determine the subsequent maturation of nascent pre $\beta$ -HDL to spherical  $\alpha$ -HDL particles (35, 36). When hepatic



**FIGURE 6:** Two-dimensional gel electrophoresis analysis of plasma of *apoA-I*<sup>-/-</sup> mice expressing the WT or mutant forms of apoA-I or the control protein GFP and agarose gel electrophoresis analysis of plasma of *apoA-I*<sup>-/-</sup> mice expressing the WT apoA-I or the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] mutant and of purified apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] protein. The plasma of mice expressing the WT apoA-I (A, B) or the control protein GFP (C) or the carboxy-terminal mutants apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] (D–F), apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] (G–I), apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] (J), apoA-I[E191A/H193A/K195A] (K) were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and Western blotting using anti-human apoA-I antibody (A, D, G, J, K) or anti-mouse apoE antibody (B, C, E, H), as described in Experimental Procedures. Panels F and I show the overlapping of panels D, E and G, H, respectively. Panel L: The plasma of mice expressing the WT apoA-I or the carboxy-terminal mutant apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and purified apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] protein were analyzed by 0.7% agarose gel electrophoresis followed by Oil Red O neutral lipid staining or Western blotting using a goat polyclonal anti-human apoA-I antibody as described in Experimental Procedures. The asterisks indicate pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL that contain WT apoA-I. The apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] mutant formed particles with faster electrophoretic mobility than the pre $\beta$ -HDL of WT apoA-I as demonstrated by Western blot analysis, which accumulated significant levels of neutral lipid (bands indicated by arrow).

ABCA1 is inactivated, pre $\beta$ -HDL fails to mature to  $\alpha$ -HDL and is catabolized rapidly by the kidney, thus resulting in low HDL levels (35, 36). Adenovirus-mediated gene transfer

of ABCA1 in total or liver-specific knockout mice for ABCA1 restored the HDL cholesterol levels in the liver-specific knockout mice but only partially in the total knockout mice (37). The combined data indicate that the liver is the major site for the initial lipidation of apoA-I, which seems to be the rate-limiting step of HDL biogenesis and the contribution of the peripheral tissues in this process appears to be small. In addition, the ABCA1/apoA-I or ABCA1/pre $\beta$ -HDL interactions in the peripheral tissues appear to enrich the initially lipidated particle with cholesterol and increase its stability (35–37). However, the fact that liver-specific inactivation of ABCA1 in mice reduces plasma HDL to approximately 17% of the WT control suggests that other proteins produced locally by the liver, such as LCAT, may be crucial for the maturation of HDL (35, 36).

A fundamental question that remains is how lipid efflux determined by *in vitro* assays is correlated to the biogenesis of HDL. Previous adenovirus-mediated gene transfer studies of apoA-I mutants to *apoA-I*<sup>-/-</sup> mice showed that a carboxy-terminal deletion (220–243) resulted in low levels of HDL cholesterol and formation of a small number of spherical particles, but no further analysis of the nature of these particles was made (19).

In the current study, we examined by adenovirus-mediated gene transfer in *apoA-I*<sup>-/-</sup> mice the effect of previously studied carboxy-terminal deletion mutant apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] along with the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] deletion mutants, as well as a mutant containing substitutions of charged amino acids in the 188–195 loop of apoA-I, on the biogenesis of HDL. Residues His 193 and Lys 195 were shown by X-ray studies to interact with the Cr-acac3 molecules that bridge the amino- and carboxy-terminal regions of apoA-I and therefore support a compact configuration of the two-domain structure of apoA-I in the crystal (9). In addition, Glu 191 contributes to a patch of charged residues on the surface of apoA-I that is close to hydrophobic residues of the carboxy-terminal domain (9). The objective was to identify critical domains or residues in the carboxy-terminal segment of apoA-I that are required for the biogenesis of HDL.

The initial parameters determined 4 days post-infection were the plasma lipid levels and the lipid FPLC profile that can initially identify putative defects in the biogenesis of HDL, the distribution of HDL in pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL subpopulations and the formation of HDL by EM. Hepatic apoA-I mRNA levels were also determined to ensure comparable levels of expression of WT and mutant apoA-I forms to interpret the observed phenotypes.

Using the above criteria, we have established that the two carboxy-terminal deletion mutants apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] that lack the 220–231 region had very low total plasma cholesterol and phospholipid levels, which were comparable to those of the control mice that express the GFP protein and very low HDL levels. The near absence of HDL was corroborated by the low plasma apoA-I levels detected by turbidimetric immunoassay and by density gradient ultracentrifugation analysis of plasma. Since the hepatic apoA-I mRNA levels and the secretion of these deletion apoA-I mutants from cells were normal, the present findings suggest that the observed low HDL levels following adenovirus infection is the result of fast clearance from plasma. Previous studies showed that lipid-free apoA-I or

partially lipidated apoA-I forms can be catabolized rapidly in the kidney by the cubulin receptor or other mechanisms (35, 38, 39).

*The Carboxy-Terminal apoA-I Mutants that Lack the 220–231 Region Fail to Form  $\alpha$ -HDL But They Can Form pre $\beta$ -HDL Particles by an ABCA1-Independent Mechanism.* Two additional important parameters, used to assess biogenesis of HDL particles, were the formation of HDL particles as determined by EM and the distribution of HDL in pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL subpopulations as determined by two-dimensional gel electrophoresis. The EM analysis showed that mutants that lack the 220–231 region fail to promote formation of spherical HDL particles. The small number of spherical HDL particles observed in the plasma of mice expressing the two mutants that lack the 220–231 region or GFP most likely represent apoE-containing HDL particles.

The two-dimensional gel electrophoresis of plasma showed that expression of apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] promoted the formation of pre $\beta$ -HDL particles but not  $\alpha$ -HDL particles. The apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] mutant promoted predominantly the formation of pre $\beta$ -HDL particles and a few  $\alpha$ -HDL particles. The preponderance of pre $\beta$ -HDL particles in the plasma of mice expressing the two carboxy-terminal mutants that lack the 220–231 region can also explain the low levels of plasma HDL.

The observed phenotypes of the carboxy-terminal mutants that lack the 220–231 region combined with their inability to promote lipid efflux and to cross-link to ABCA1 (2, 28) suggest a blockage of the first step in the biogenesis of HDL, which involves functional interactions between apoA-I and ABCA1. Such interactions are necessary for the correct lipidation of apoA-I and the formation of HDL.

The lack of HDL formation may reflect inability of apoA-I to associate with ABCA1 (28), as well as inability to associate with lipids (3), or both. A recent study of refolding of apoA-I during transition from 5–0.45 M guanidine HCl using stopped flow circular dichroism showed that deletion of the 186–243 carboxy-terminal segment of apoA-I increases the free energy required for the transition from the native state to a partially unfolded intermediate state (40). It has been proposed that association of apoA-I with lipids requires partial unfolding of apoA-I (40–42). Thus, the observed change in the free energy required for the transition from the native state to the partially unfolded intermediate state of apoA-I[ $\Delta$ (186–243)] may affect the association of apoA-I with lipids and possibly its interactions with ABCA1 that lead to lipid efflux and promote the formation of HDL (40).

In contrast to the properties of the carboxy-terminal deletion mutants that lack the 220–231 region, mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] that retains the 220–231 region and the point mutant apoA-I[E191A/H193A/K195A] had normal HDL levels. The EM and two-dimensional gel electrophoresis analysis showed formation of spherical HDL and normal pre $\beta$ - and  $\alpha$ -HDL subpopulations. The overall phenotype of mice expressing these mutants was similar to this observed in mice expressing the WT apoA-I. The ability of the apoA-I[ $\Delta$ (232–243)] and apoA-I[E191A/H193A/K195A] mutants to promote formation of normal HDL particles is consistent with their ability to promote normal ABCA1-mediated lipid efflux in vitro.

Although more rigorous studies may be required to assess the importance of charged residues of the carboxy-terminal region in the biogenesis of HDL, the current findings indicate that charged amino acids Glu191, His193, and Lys195 are not involved in ABCA1/apoA-I interactions or interactions of the carboxy- and amino-terminal domains of apoA-I that are important for the biogenesis of HDL. Previous studies also showed that substitutions of charged amino acids Glu234, Glu235, Lys238, and Lys239 by Ala did not affect the biogenesis of HDL (19), whereas alteration of hydrophobic residues in the 211–229 region of apoA-I prevented the maturation of HDL and led to the accumulation of discoidal HDL particles (19).

*The Amino-Terminal 1–184 and 1–219 Region of apoA-I Can Promote Formation of pre $\beta$ -HDL Particles in an ABCA1-Independent Process.* Numerous studies have shown that pre $\beta$ -HDL particles can be formed de novo by an ABCA1-dependent process that leads to the formation of HDL (35–37, 43–47). In addition, processes catalyzed by hepatic lipase, cholesterol ester transfer protein, and phospholipid transfer protein can generate pre $\beta$ -HDL from  $\alpha$ -HDL particles (48–52). Furthermore, deficiency of apoM inhibits the formation of pre $\beta$ -HDL (53, 54). Previous studies also showed that the plasma of humans with Tangier disease (11, 55) and of ABCA1<sup>-/-</sup> mice (24) contains pre $\beta$ -HDL but lacks  $\alpha$ -HDL particles. In the ABCA1<sup>-/-</sup> mice, the composition of HDL is abnormal and has an increased PL/apoA-I ratio (24). In addition, inhibition of ABCA1 in HepG2 cells and macrophage cultures by glyburide inhibited the formation of  $\alpha$ -HDL particles but did not affect the formation of pre $\beta$ -HDL particles (56). All these findings indicate that some types of pre $\beta$ -HDL particles can be formed independently of apoA-I/ABCA1 interactions.

Similarly, in this study we show an abnormal PL/apoA-I ratio of the HDL fraction obtained by FPLC or density gradient ultracentrifugation in mice expressing the apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] and apoA-I[ $\Delta$ (220–243)] mutants. Furthermore, the electrophoretic mobility of the lipid-free apoA-I[ $\Delta$ (185–243)] is different from that of the lipidated particles formed in mice expressing this carboxy-terminal mutant.

Overall, our studies establish that the 220–231 region of apoA-I is required for functional interactions between apoA-I and ABCA1 that are necessary for the biogenesis of  $\alpha$ -HDL particles and the amino-terminal domain that lacks the 220–231 region can form pre $\beta$ -HDL particles in an ABCA1-independent process.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Efstratios Stratikos for critical reading and comments and Ms. Gayle Forbes for technical assistance.

## REFERENCES

- Zannis, V. I., Kardassis, D., and Zanni, E. E. (1993) Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes, *Adv. Hum. Genet.* 21, 145–319.
- Chroni, A., Liu, T., Gorshkova, I., Kan, H. Y., Uehara, Y., von Eckardstein, A., and Zannis, V. I. (2003) The central helices of apoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220–231 of the wild-type apoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo, *J. Biol. Chem.* 278, 6719–6730.

3. Laccotripe, M., Makrides, S. C., Jonas, A., and Zannis, V. I. (1997) The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 272, 17511–17522.
4. Liu, T., Krieger, M., Kan, H. Y., and Zannis, V. I. (2002) The effects of mutations in helices 4 and 6 of apoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport, *J. Biol. Chem.* 277, 21576–21584.
5. Zannis, V. I., Chroni, A., Kypreos, K. E., Kan, H. Y., Cesar, T. B., Zanni, E. E., and Kardassis, D. (2004) Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer, *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 151–166.
6. Li, W. H., Tanimura, M., Luo, C. C., Datta, S., and Chan, L. (1988) The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution, *J. Lipid Res.* 29, 245–271.
7. Nolte, R. T., and Atkinson, D. (1992) Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism, *Biophys. J.* 63, 1221–1239.
8. Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A., and Brouillette, C. G. (1997) Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12291–12296.
9. Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M., and 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.
10. Wang, N., Silver, D. L., Costet, P., and Tall, A. R. (2000) Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1, *J. Biol. Chem.* 275, 33053–33058.
11. Assmann, G., von Eckardstein, A., and Brewer, H. B. (2001) Familial analphalipoproteinemia: Tangier disease, in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., Eds.) pp 2937–2960, McGraw-Hill, New York.
12. 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.
13. 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.
14. Krieger, M. (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems, *J. Clin. Invest.* 108, 793–797.
15. Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A. R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9774–9779.
16. Jiang, X. C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O. L., and Tall, A. R. (1999) Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels, *J. Clin. Invest.* 103, 907–914.
17. Chroni, A., Kan, H. Y., Kypreos, K. E., Gorshkova, I. N., Shkodrani, A., and Zannis, V. I. (2004) Substitutions of glutamate 110 and 111 in the middle helix 4 of human apolipoprotein A-I (apoA-I) by alanine affect the structure and in vitro functions of apoA-I and induce severe hypertriglyceridemia in apoA-I-deficient mice, *Biochemistry* 43, 10442–10457.
18. Chroni, A., Kan, H. Y., Shkodrani, A., Liu, T., and Zannis, V. I. (2005) Deletions of helices 2 and 3 of human apoA-I are associated with severe dyslipidemia following adenovirus-mediated gene transfer in apoA-I-deficient mice, *Biochemistry* 44, 4108–4117.
19. Reardon, C. A., Kan, H. Y., Cabana, V., Blachowicz, L., Lukens, J. R., Wu, Q., Liadaki, K., Getz, G. S., and Zannis, V. I. (2001) In vivo studies of HDL assembly and metabolism using adenovirus-mediated transfer of ApoA-I mutants in ApoA-I-deficient mice, *Biochemistry* 40, 13670–13680.
20. Chroni, A., Duka, A., Kan, H. Y., Liu, T., and Zannis, V. I. (2005) Point mutations in apolipoprotein A-I mimic the phenotype observed in patients with classical lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency, *Biochemistry* 44, 14353–14366.
21. Roghani, A., and Zannis, V. I. (1988) Alterations of the glutamine residues of human apolipoprotein AI propeptide by in vitro mutagenesis. Characterization of the normal and mutant protein forms, *Biochemistry* 27, 7428–7435.
22. 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.
23. Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (1996) Two-dimensional nondenaturing electrophoresis of lipoproteins: applications to high-density lipoprotein speciation, *Methods Enzymol.* 263, 251–259.
24. Francone, O. L., Subbaiah, P. V., van Tol, A., Royer, L., and Haghpassand, M. (2003) Abnormal phospholipid composition impairs HDL biogenesis and maturation in mice lacking Abca1, *Biochemistry* 42, 8569–8578.
25. Plump, A. S., Azrolan, N., Odaka, H., Wu, L., Jiang, X., Tall, A., Eisenberg, S., and Breslow, J. L. (1997) ApoA-I knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apoA-I up-regulation in heterozygotes, *J. Lipid Res.* 38, 1033–1047.
26. Scott, B. R., McManus, D. C., Franklin, V., McKenzie, A. G., Neville, T., Sparks, D. L., and Marcel, Y. L. (2001) The N-terminal globular domain and the first class A amphipathic helix of apolipoprotein A-I are important for lecithin:cholesterol acyltransferase activation and the maturation of high density lipoprotein in vivo, *J. Biol. Chem.* 276, 48716–48724.
27. McManus, D. C., Scott, B. R., Frank, P. G., Franklin, V., Schultz, J. R., and Marcel, Y. L. (2000) Distinct central amphipathic alpha-helices in apolipoprotein A-I contribute to the in vivo maturation of high density lipoprotein by either activating lecithin-cholesterol acyltransferase or binding lipids, *J. Biol. Chem.* 275, 5043–5051.
28. Chroni, A., Liu, T., Fitzgerald, M. L., Freeman, M. W., and Zannis, V. I. (2004) Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1, *Biochemistry* 43, 2126–2139.
29. Matsunaga, T., Hiasa, Y., Yanagi, H., Maeda, T., Hattori, N., Yamakawa, K., Yamanouchi, Y., Tanaka, I., Obara, T., and Hamaguchi, H. (1991) Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2793–2797.
30. Neufeld, E. B., Demosky, S. J., Jr., Stonik, J. A., Combs, C., Remaley, A. T., Duverger, N., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2002) The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 974–979.
31. Neufeld, E. B., Remaley, A. T., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Cooney, A. M., Comly, M., Dwyer, N. K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H. B., Jr. (2001) Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter, *J. Biol. Chem.* 276, 27584–27590.
32. Takahashi, Y., and Smith, J. D. (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11358–11363.
33. Smith, J. D., Waelde, C., Horwitz, A., and Zheng, P. (2002) Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux, *J. Biol. Chem.* 277, 17797–17803.
34. Rohrer, L., Cavalier, C., Fuchs, S., Schluter, M. A., Volker, W., and von Eckardstein, A. (2006) Binding, internalization and transport of apolipoprotein A-I by vascular endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 186–194.
35. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., and Parks, J. S. (2005) Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I, *J. Clin. Invest.* 115, 1333–1342.
36. Singaraja, R. R., Stahmer, B., Brundert, M., Merkel, M., Heeren, J., Bissada, N., Kang, M., Timmins, J. M., Ramakrishnan, R., Parks, J. S., Hayden, M. R., and Rinninger, F. (2006) Hepatic ATP-binding cassette transporter A1 is a key molecule in high-density lipoprotein cholesterol ester metabolism in mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1821–1827.
37. Singaraja, R. R., Van Eck, M., Bissada, N., Zimetti, F., Collins, H. L., Hildebrand, R. B., Hayden, A., Brunham, L. R., Kang, M. H., Fruchart, J. C., van Berkel, T. J., Parks, J. S., Staels, B., Rothblat, G. H., Fievret, C., and Hayden, M. R. (2006) Both hepatic

- and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo, *Circulation* 114, 1301–1309.
38. Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E. I., Aminoff, M., de la, C. A., Krahe, R., Verroust, P. J., and Moestrup, S. K. (1999) The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein, *Nat. Med.* 5, 656–661.
  39. Hammad, S. M., Stefansson, S., Twal, W. O., Drake, C. J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer, H. B., Jr., and Argraves, W. S. (1999) Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10158–10163.
  40. Gross, E., Peng, D. Q., Hazen, S. L., and Smith, J. D. (2006) A novel folding intermediate state for apolipoprotein A-I: role of the amino and carboxy termini, *Biophys. J.* 90, 1362–1370.
  41. Gursky, O., and Atkinson, D. (1996) Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2991–2995.
  42. Banuelos, S., and Muga, A. (1995) Binding of molten globule-like conformations to lipid bilayers. Structure of native and partially folded alpha-lactalbumin bound to model membranes, *J. Biol. Chem.* 270, 29910–29915.
  43. Castro, G. R., and Fielding, C. J. (1988) Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein, *Biochemistry* 27, 25–29.
  44. Forte, T. M., Goth-Goldstein, R., Nordhausen, R. W., and McCall, M. R. (1993) Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles, *J. Lipid Res.* 34, 317–324.
  45. Forte, T. M., Bielicki, J. K., Goth-Goldstein, R., Selmek, J., and McCall, M. R. (1995) Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT, *J. Lipid Res.* 36, 148–157.
  46. Duong, P. T., Collins, H. L., Nickel, M., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2006) Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I, *J. Lipid Res.* 47, 832–843.
  47. Chau, P., Nakamura, Y., Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (2006) Mechanism of prebeta-HDL formation and activation, *Biochemistry* 45, 3981–3987.
  48. Clay, M. A., Newnham, H. H., and Barter, P. J. (1991) Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro, *Arterioscler. Thromb.* 11, 415–422.
  49. Hennessy, L. K., Kunitake, S. T., and Kane, J. P. (1993) Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre-beta high-density lipoprotein particles, *Biochemistry* 32, 5759–5765.
  50. Liang, H. Q., Rye, K. A., and Barter, P. J. (1994) Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins, *J. Lipid Res.* 35, 1187–1199.
  51. von Eckardstein, A., Jauhiainen, M., Huang, Y., Metso, J., Langer, C., Pussinen, P., Wu, S., Ehnholm, C., and Assmann, G. (1996) Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL, *Biochim. Biophys. Acta* 1301, 255–262.
  52. Settasatian, N., Duong, M., Curtiss, L. K., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Huuskonen, J., and Rye, K. A. (2001) The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein, *J. Biol. Chem.* 276, 26898–26905.
  53. Wolfrum, C., Poy, M. N., and Stoffel, M. (2005) Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis, *Nat. Med.* 11, 418–422.
  54. Xu, N., and Dahlback, B. (1999) A novel human apolipoprotein (apoM), *J. Biol. Chem.* 274, 31286–31290.
  55. Asztalos, B. F., Brousseau, M. E., McNamara, J. R., Horvath, K. V., Roheim, P. S., and Schaefer, E. J. (2001) Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease, *Atherosclerosis* 156, 217–225.
  56. Krimbou, L., Hajj, H. H., Blain, S., Rashid, S., Denis, M., Marcil, M., and Genest, J. (2005) Biogenesis and speciation of nascent apoA-I-containing particles in various cell lines, *J. Lipid Res.* 46, 1668–1677.
  57. Karathanasis, S. K., Salmon, E., Haddad, I. A., and Zannis, V. I. (1985) in *Biochemistry and Biology of Plasma Proteins* (Scanu, A. M. and Spector, A. A., Eds.) pp 474–493, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

BI602354T