ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Α-Ι ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΛΛΙΟΠΗ Ν. ΛΙΑΔΑΚΗ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2000

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάσθηκε στην ανάλυση της δομής και της λειτουργίας της αποA-I. Σκοπός της διατριβής ήταν να κατανοηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο συγκεκριμένες λειτουργικές περιοχές και επιμέρους αμινοξέα της αποA-I συμβάλλουν στις φυσιολογικές της λειτουργίες όπως στην σύνδεση με φωσφολιπίδια, την ενεργοποίηση του ενζύμου Ακυλοτρανσφεράση της Λεκιθίνης-Χοληστερόλης (LCAT), την σύνδεση με τον υποδοχέα ΄καθαριστή' τάξης Β, τύπου Ι (SR-BI). Πραγματοποιήθηκε μεταλλαξιγένεση στο ανθρώπινο γονίδιο της αποA-I, και μετά από επιμόλυνση και επιλογή δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το μέσο καλλιέργειας και χρησιμοποιήθηκαν σε λειτουργικές και δομικές μελέτες.

Τα πειράματα σύνδεσης των μεταλλαγμένων μορφών με το φωσφολιπίδιο Διμυριστοϋλ-φωσφατιδυλο-χολίνη (DMPC) έδειξαν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση της αποA-I με λιποσώματα φωσφολιπιδίων. Η απαλοιφή τμημάτων της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης (αμινοξέα 167-243) (έλικες 7-10) αναστέλλει την αλληλεπίδραση των μεταλλαγμένων μορφών με λιποσώματα φωσφολιπιδίων. Αντίθετα η σημειακή αντικάσταση των αμινοξέων γλυκινών στις θέσεις 185 και 186 από προλίνες δεν επηρεάζει την ταχύτητα διαλυτοποίησης λιποσωμάτων φωσφολιπιδίων.

Η μελέτη της ικανότητας ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL, που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές έδειξε ότι σε σύγκριση με τον φυσικό τύπο της αποA-I οι μεταλλαγμένες μορφές (Δ165-175) και (G185→P, G186→P) μειώνουν την ενεργοποίηση του νεζύμου LCAT σε ποσοστό 60%. Οι μεταλλαγμένες μορφές (Δ187-197), (Δ185-243), (Δ198-243), (Δ220-243) και (Δ232-243) μειώνουν ακόμη περισσότερο την ενεργοποίηση σε ποσοστά 37-48 %. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η έλικα 7 καθώς και οι καρβοξυτελικές έλικες 8-10 είναι σημαντικές για την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT.

Τα πειράματα διασύνδεσης έδειξαν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I συμμετέχει στον σχηματισμό ολιγομερών της πρωτεΐνης σε διάλυμα. Η απαλοιφή τμημάτων της καρβοξυτελικής περιοχής της αποA-I επιτρέπει τον σχηματισμό μικρής ποσότητας διμερών, αλλά εμποδίζει τον σχηματισμό τριμερών και τετραμερών, σε υψηλές συγκεντρώσεις σε διάλυμα.Τα πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος

έδειξαν ότι υπάρχει επιβράδυνση στην κινητική της έκκρισης των μεταλλαγμένων μορφών (Δ165-243) και (Δ175-243). Ο χρόνος ημίσσειας ζωής της ενδοκυττάριας μορφής της αποA-I για τις μεταλλαγμένες μορφές είναι περίπου διπλάσιος αυτού της αποA-I του φυσικού τύπου. Οι απαλοιφές των καρβοξυτερματικών αμινοξέων 165-243 ή 175-243 πιθανόν αποσταθεροποιούν την αποA-I μέσα στα κύτταρα και επιβραδύνουν την έκκρισή της.

Στα πλαίσια της μελέτης της σύνδεσης της αποA-I στον υποδοχέα της HDL, SR-BI, αναπτύχθηκε μια νέα τεχνική την οποία ονομάσαμε τεχνική ανοσο-υποδοχέα. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απλή και εναλλακτική μέθοδος για την εκτίμηση της πρόσδεσης συνδετών που περιέχουν αποA-I στον υποδοχέα SR-BI χωρίς να απαιτείται η ραδιοσήμανσή τους. Με την τεχνική αυτή η πρόσδεση του μη-ραδιοσημασμένου συνδέτη σε κύτταρα εκτιμάται με ποσοτική ανοσο-αποτύπωση. Η ανάλυση διαφόρων συνδετών έδειξε ότι δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL που περιέχουν αποA-I συνδέονται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI, ενώ η ελεύθερη αποA-I και η μορφή της πρε-β-1 HDL δεν εμφανίζουν SR-BI-εξαρτώμενη σύνδεση. Επιπλέον η αύξηση της πυκνότητας των σωματιδίων της σφαιρικής HDL μειώνει την συγγένεια σύνδεσης τους με τον υποδοχέα SR-BI. Η μελέτη της σύνδεσης των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I υπό την μορφή δισκοειδών σωματιδίων έδειξε ότι η ισχυρή σύνδεση των σωματιδίων στον υποδοχέα SR-BI μπορεί να επιτευχθεί με την κεντρική περιοχή του μορίου της αποA-I (αμινοξέα 60-184), σε συνδυασμό με είτε την καρβοξυτελική είτε την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης. Συνεπώς η αμινοτελική (1-59) και η καρβοξυτελική (185-243) περιοχή του μορίου της αποA-I επηρεάζουν με ανεξάρτητο μηχανισμό την σύνδεση στον υποδοχέα SR-BI, είτε άμεσα, είτε μέσω αλλαγών στην διαμόρφωση της κεντρικής περιοχής (αμινοξέα 60-184). Συμπερασματικά οι μελέτες επιβεβαιώνουν τον σημαντικό ρόλο της αποA-I στην σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI.

Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I θα χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σε μελέτες που αφορούν την επιλεκτική μεταφορά εστέρων χοληστερόλης, μέσω του υποδοχέα SR-BI, την έξοδο χοληστερόλης από κύτταρα, την σύνδεση σε άλλους κυτταρικούς υποδοχείς, καθώς και σε in vivo μελέτες με μεταφορά μέσω αδενοϊών σε ποντίκια.

ABSTRACT

Apolipoprotein A-I is the major protein constituent of the high density lipoprotein (HDL) particles and plays a crucial role in lipid transport and metabolism. The subject of this study was the structural and functional analysis of human apoA-I. The main focus was to understand how specific domains and residues of apoA-I contribute to its physiological functions, that is its ability to bind to phospholipids and form high density lipoprotein (HDL) particles, to activate lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) and to bind to scavenger receptor, class B, type I (SR-BI). We mutated the human apoA-I gene and generated by transfection and selection stable cells lines expressing variant forms of apoA-I. The mutant proteins were purified from the culture media and were used in a variety of functional and structural assays.

Dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC) binding assays showed that the carboxy-terminal region of apoA-I is critical for the interaction of apoA-I with multilamellar phospholipid vesicles. The deletion of regions in the carboxy-terminal domain (residues 167-243) (helices 7-10) inhibits the mutant proteins from solubilizing DMPC vesicles. In contrast the substitution of glycines at positions 185 and 186 with prolines did not affect the ability of the mutant protein to interact and solubilize phospholipid vesicles.

LCAT analysis, using reconstituted HDL particles containing the mutant apoA-I forms, showed that the variants (Δ165-175) and (G185→P, G186→P) reduced LCAT activation (60% compared to the wild type apoA-I). Mutants (Δ187-197), (Δ185-243), (Δ198-243), (Δ220-243) and (Δ232-243) reduced even more the activation to 37-48 % of the wild type apoA-I. These findings indicate that helix 7 and the carboxy-terminal helices 8-10 are important for LCAT activation.

Cross-linking experiments showed that the carboxy-terminal domain of apoA-I participates in the self association of the protein in solution. The deletion of carboxy-terminal domains of the protein results in formation of lower quantities of dimers, and inhibits the formation of higher order oligomers (aggregates) in solution.

Pulse chase experiments showed a delay in the kinetics of secretion of the mutant forms (Δ165-243) and (Δ175-243), as demonstrated by the double increase in the half time of the intracellular forms of the mutant proteins compared to that of the wild type apoA-I. The deletion of the carboxy terminal amino acids 165-243 or 175-243 probably

destabilizes the protein inside the cell and delays its secretion.

In the context of studying the binding of apoA-I to the HDL receptor SR-BI, a new technique, called immunoreceptor assay, was developed and was used as a simple and powerful alternative to evaluate receptor-binding parameters of a variety of apoA-I-containing ligands, without the need for iodination. In this assay the unlabeled receptor-associated ligand is detected by quantitative immunoblotting. The analysis of different ligands showed that discoidal reconstituted HDL particles containing apoA-I bind with high affinity to SR-BI, while the lipid-free apoA-I and the pre-β-1 HDL do not exhibit SR-BI-dependent binding. Moreover the increase in the density of spherical HDL resulted in decrease in the binding affinity of HDL to SR-BI. Studies of the binding of reconstituted HDL particles containing the variant apoA-I froms showed that optimal binding of discoidal particles to SR-BI can be achieved by the central domain of apoA-I (residues 60-184) combined with either the amino or carboxy terminal domain. These findings demonstrate the important role of apoA-I in HDL binding to SR-BI and indicate that the amino (1-59) and carboxy (185-243) termini of apoA-I independently influence binding to SR-BI, either directly or through changes in the conformation of the core of apoA-I (residues 60-184).

In addition to their use in the present study, the variant apoA-I forms generated will be valuable in the future for studies of selective uptake of cholesterol, mediated by SR-BI, for promoting cholesterol efflux from cells, for binding to other cell surface receptors, and for in vivo studies in transgenic animals.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Περίληψη	i
Abstract	iii
Περιεχόμενα	v
Εικόνες	x
Πίνακες	xii
Συντομογραφίες	xiii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Γενική εισαγωγή στις λιποπρωτεΐνες	1
Α.Ταξινόμηση-Δομή-Λειτουργία-Μεταβολισμός	1
Β. Απολιποπρωτεΐνες	11
2. Απολιποπρωτεΐνη Α-I	12
Α. Σημασία της αποΑ-I	12
Β. Το γονίδιο της αποΑ-I	13
Γ. Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της αποΑ-I	13
Δ. Βιοσύνθεση της αποΑ-I	17
Ε. Δομή της αποΑ-I	22
Ι. Δομή της αποΑ-I σε δισκοειδή σωματίδια HDL	29
ΙΙ. Δομή της αποΑ-I σε σφαιρικά σωματίδια HDL	37
ΣΤ. Λειτουργίες της αποΑ-I	38
1. Σύνδεση με λιπίδια και λιποπρωτεΐνες	38
Ι. Περιοχές της αποΑ-I που συμμετέχουν στην σύνδεση με φωσφολιπίδια και με την HDL	38
ΙΙ. Ταξινόμηση της HDL του πλάσματος	39
α. Ταξινόμηση με βάση το μέγεθος	39
β. Ταξινόμηση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	42
γ. Ταξινόμηση με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας	43
ΙΙΙ. Βιογένεση και καταβολισμός της HDL	43
Ο υποδοχέας της κουβιλίνης	51
IV. Σύνδεση της αποΑ-I με λιπίδια σε δοκιμαστικό σωλήνα-σχηματισμός σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL)	51
2. Ενεργοποίηση του ενζύμου Ακυλοτρανσφεράση της Λεκιθίνης	

Χοληστερόλης (LCAT) 54

Σελίδα

I. Δομή, λειτουργία, γενετική του ενζύμου LCAT 54

II. Η αποA-I ως ενεργοποιητής του ενζύμου LCAT 58

3. Συμμετοχή των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποA-I στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης 66

Η ρυθμιστική πρωτεΐνη εξόδου χοληστερόλης (CERP), προϊόν του γονιδίου ABC1 συμμετέχει στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης

Σχέση της CERP (ABC1) με την νόσο του Tangier 69

4. Ρόλος της αποA-I ελεύθερης λιπιδίων, στην έξοδο της κυτταρικής χοληστερόλης 71

5. Φυσικές μεταλλάξεις της αποA-I 72

6. Μοριακές βλάβες που οδηγούν στην έλλειψη της αποA-I και της HDL 74

7. Μελέτη του ρόλου της αποA-I και άλλων πρωτεϊνών στον μεταβολισμό της HDL και στην αθηρωμάτωση με βάση μελέτες διαγονιδιακών ζώων 75

3. Εισαγωγή στους υποδοχείς 'καθαριστές' (scavenger receptors) 80

A. Ανακάλυψη υποδοχέων ΄καθαριστών' (scavenger) 80

B. Τάξεις υποδοχέων 'καθαριστών'-Ονοματολογία-Δράσεις-Λειτουργίες 81

4. Υποδοχείς καθαριστές τάξης Β 87

A. CD36 87

B. Ο υποδοχέας SR-BI 88

I. Σημασία του υποδοχέα SR-BI 88

II. Κλωνοποίηση του SR-BI 89

III. Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου του υποδοχέα SR-BI 89

IV. Η πρωτεΐνη SR-BI 91

V. Λειτουργίες του υποδοχέα SR-BI 92

1. Ειδικότητα πρόσδεσης διαφόρων συνδετών 92

2. Η σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI προάγει την επιλεκτική είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL στο κύτταρο 94

3. Ο ρόλος του υποδοχέα SR-BI στην έξοδο της χοληστερόλης από το κύτταρο 95

4. Ο υποδοχέας SR-BI ως υποδοχέας της HDL-Ρόλος του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό της HDL 96

I. Κατανομή της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε ιστούς πειραματοζώων 96

II. Ορμονική ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε κυτταρικές καλλιέργειες και πειραματόζωα 97

α. Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε επινεφρίδια 98

Σελίδα

β. Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε ωοθήκες 99

γ. Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε όρχεις 100

δ. Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ 100

III. Επίδραση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών HDL σε κύτταρα και πειραματόζωα 102

5. Επίδραση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών LDL 104

6. Ρόλος του υποδοχέα SR-BI στην αθηρωμάτωση 105

5. Σκοπός της διατριβής 108

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά 109

Μέθοδοι 110

1.Καθαρισμός ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας. 110

2. Αντιδράσεις υποκλωνοποίησης 110

Α. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα 110

Β. Αντίδραση λιγάσης 111

Γ. Μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNAσε βακτηριακά κύτταρα HB101 111

3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA 113

Α. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης 114

Β. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα 115

Γ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με στήλη QIAGEN 117

4. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης 117

Α. Ηλεκτροέκλουση 117

Β. Χρήση στήλης G–10 117

5. Ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με χρήση ως μήτρα το δίκλωνο DNA (sequencing) 117

6. Καλλιέργειες κυττάρων και πειράματα επιμόλυνσης 119

Α. Επιμόλυνση κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια

Τεχνική της συν-κατακρήμνισης του DNA με $Ca_3(PO_4)_2$ 119

Β. Ραδιοσήμανση κυττάρων με ^{35}S μεθειονίνη μετά από παροδική επιμόλυνση. 121

Γ. Επιμόλυνση κυττάρων με σκοπό την δημιουργία μόνιμων κυτταρικών σειρών που εκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες 122

Σελίδα

Δ. Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών από μόνιμα μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές 122
Ε. Ψύξη και απόψυξη κλώνων 123
ΣΤ. Καλλιέργεια των μόνιμα μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών σε μεγάλη κλίμακα (τεχνολογία περιστρεφόμενων κυλινδρικών φιαλών) 123
7. Χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I 125
8. Ανάλυση των πρωτεϊνών των κυτταρικών σειρών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS 127
9. Ανάλυση πρωτεϊνών από παροδική επιμόλυνση σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων 128
10. Καθαρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I από το μέσο καλλιέργειας. 130
11. Ανάλυση των πρωτεϊνών με μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσο-αποτύπωση (western blotting) 131
12. Μελέτες σύνδεσης της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC 132
13. Μελέτες διασύνδεσης μέσω του συνδέτη BS^3 133
14. Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) 133
15. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο 134
16. Μελέτες ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT 135
17. Πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος 136
18**.** Πειράματα σύνδεσης με τον υποδοχέα SR-BI 137
Α. Κυτταρική καλλιέργεια 137
Β. Απομόνωση λιποπρωτεϊνών, ραδιοσήμανση, και χαρακτηρισμός 137
Γ. Πειράματα κυτταρικής σύνδεσης και συναγωνισμού με χρήση ραδιοσημασμένων συνδετών 138
Δ. Πειράματα κυτταρικής σύνδεσης με χρήση μη ραδιοσημασμένων συνδετών Τεχνική ανοσο-υποδοχέα (Immunoreceptor assay) 139
19. Πλασμιδιακές κατασκευές 140

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Πλασμίδια-φορείς 141
Α. PUC19, PUC19A-I, PUC19A-I (NotI, XhoI) 141
Β. PBMT3X, PBMT3XA-I 144

Σελίδα

2. Πολλαπλασιασμός του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και δημιουργία των μεταλλάξεων του γονιδίου της αποA-I στον φορέα PUC19A-I (NotI, XhoI) 147
3. Υποκλωνοποίηση των μεταλλάξεων της αποA-I στον φορέα έκφρασης PBMT3XA-I 153
4. Κυτταρική επιμόλυνση, επιλογή και χαρακτηρισμός σταθερών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. 156
Α. Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών 156
Β. Ανάλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία. 157
5. Απομόνωση του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I 173
6. Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης και ανοσο-αποτύπωση 184
7. Σύνδεση των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με λιπίδια 187
8. Σχηματισμός ολιγομερών από τον φυσικό τύπο και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I 198
9. Ανάλυση των σωματιδίων rHDL των μορφών της αποA-I με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 204
10. Ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I 212
11. Κινητική της έκκρισης του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I 217
12. Πειράματα σύνδεσης με τον υποδοχέα SR-BI 226
Α. Σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI 226
1.Τεχνική ραδιο-υποδοχέα (Radioreceptor assay) 226
2.Τεχνική ανοσο-υποδοχέα (Immunoreceptor assay) 230
3. Επίδραση της πυκνότητας της HDL στην σύνδεση με τον υποδοχέα SR-BI 235
Β. Σύνδεση της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI 240
Γ. Επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I στην σύνδεση με τον υποδοχέα SR-BI 250
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 263
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 284
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ 321

ΕΙΚΟΝΕΣ

	Σελίδα
Εικόνα 1	3
Εικόνα 2	6
Εικόνα 3	10
Εικόνα 4	16
Εικόνα 5	19
Εικόνα 6	21
Εικόνα 7	24ii
Εικόνα 8	26
Εικόνα 9	28
Εικόνα 10	31
Εικόνα 11	35
Εικόνα 12	41
Εικόνα 13	46
Εικόνα 14	50
Εικόνα 15	57
Εικόνα 16	60
Εικόνα 17	84
Εικόνα 18	143
Εικόνα 19	146
Εικόνα 20	150
Εικόνα 21	155
Εικόνα 22	160
Εικόνα 23	163
Εικόνα 24	166
Εικόνα 25	169
Εικόνα 26	172
Εικόνα 27	176-183
Εικόνα 28	186
Εικόνα 29	190-197

Σελίδα

Εικόνα 30	200
Εικόνα 31	203
Εικόνα 32	207-209
Εικόνα 33	211
Εικόνα 34	215
Εικόνα 35	221
Εικόνα 36	223
Εικόνα 37	225
Εικόνα 38	229
Εικόνα 39	234
Εικόνα 40	237
Εικόνα 41	239
Εικόνα 42	242
Εικόνα 43	246
Εικόνα 44	249
Εικόνα 45	252
Εικόνα 46	255
Εικόνα 47	257
Εικόνα 48	259
Εικόνα 49	262

ΠΙΝΑΚΕΣ

Σελίδα

Πίνακας 1 36

Πίνακας 2 73

Πίνακας 3 74

Πίνακας 4 120

Πίνακας 5 121

Πίνακας 6 151

Πίνακας 7 152

Πίνακας 8 216

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HDL:	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoprotein)
Απο:	Απολιποπρωτεΐνη
LCAT:	Ακυλοτρανσφεράση της Λεκιθίνης-χοληστερόλης (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase)
SR:	Υποδοχέας 'καθαριστής' (Scavenger Receptor)
SR-BI:	Υποδοχέας καθαριστής τάξης Β, τύπου Ι (scavenger receptor, class B, type I)
LDL:	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein)
VLDL:	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoprotein)
IDL:	Λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας (Intermediate Density Lipoprotein)
rHDL:	Δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (discoidal reconstituted HDL particles)
CHO:	Ωοθήκη κινέζικου χάμστερ (Chinese Hamster Ovary)
ldlA:	κυτταρική σειρά CHO που δεν εκφράζει λειτουργικό υποδοχέα της LDL (LDL receptor-deficient CHO cell line)
ldlA[mSR-BI]:	ldlA κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI του ποντικού (murine SR-BI expressing ldlA cells)
C127:	κυτταρική σειρά που προέρχεται από όγκο μαστικού αδένα του ποντικού
LRP:	Πρωτεΐνη σχετική με τον υποδοχέα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL Receptor Related protein)
LDLR:	Υποδοχέας της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDLReceptor)
VLDLR:	Υποδοχέας της πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (VLDL)
CERP:	Ρυθμιστική πρωτεΐνη εξόδου της χοληστερόλης (Cholesterol Efflux Regulatory protein)
Lp:	Λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο
DMEM:	Dulbeco's modified Eagle medium
TLC:	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography)

FAF-BSA:	Ελεύθερη λιπιδίων αλβουμίνη ορού μόσχου (fatty acid-free bovine serum albumin)
POPC:	1-παλμυτοϋλο-2-ολεοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (1-palmitoyl-2-oleoyl-L-phosphatidylcholine
DMPC:	Διμυρυστοϋλο-φωσφατιδυλο-χολίνη (Dimyristoyl- Phosphatidylcholine)
FLD:	Οικογενής έλλειψη LCAT (Familial LCAT deficiency)
FED:	Ασθένεια ματιού ψαριού (Fish eye Disease)
HL:	Ηπατική λιπάση (Hepatic Lipase)
LPL:	Λιποπρωτεϊνική λιπάση (Lipoprotein Lipase)
PLTP:	Πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων (Phospholipid Transfer Protein)
HTGL:	Ηπατική λιπάση των τριγλυκεριδίων (Hepatic Triglyceride Lipase)
CETP:	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (cholesteryl ester transfer protein)
RXRα:	Υποδοχέας του ρετινοειδούς Χ (Retinoid X Receptor)
RARα:	Υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος (Retinoic acid Receptor)
T3Rβ:	Υποδοχέας της Τριιοδοθυρονίνης (T3 Receptor)
HNF4:	Ηπατικός Μεταγραφικός παράγοντας-4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4)
C/EBP:	Πρωτεΐνη πρόσδεσης σε CCAAT/ Ενισχυτές (CCAAT/Enhancer Binding Protein)
SP1:	Πρωτεΐνη εξειδίκευσης (Specificity Protein 1)
SREBP:	Πρωτεΐνη πρόσδεσης σε στοιχεία που ρυθμίζονται από χοληστερόλη (Sterol Regulatory Element Binding Protein)
ACTH:	Αδρενοκορτικοτροπίνη (Adrenocotricotrophic Hormone)
hCG:	Χοριονική Γοναδοτροπίνη του ανθρώπου (human Chorionic Gonadotropin)
LPS:	Λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharite)
KDa:	Χιλιοδαλτόνιο
Kb:	Χιλιοβάση
σ.α.λ.:	στροφές ανά λεπτό

1) ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Α) Ταξινόμηση-Δομή-Λειτουργία-Μεταβολισμός

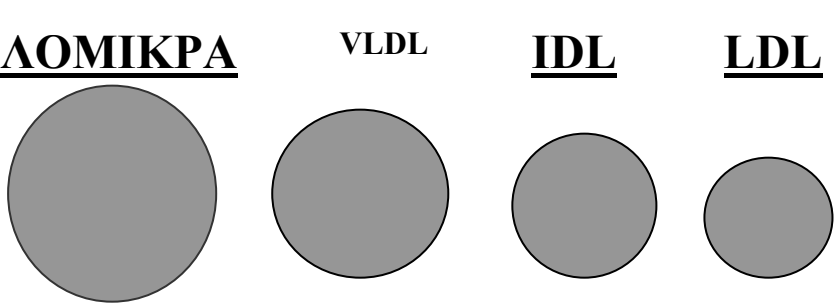
Τα λιπίδια αποτελούν μία σημαντική τάξη βιολογικών μορίων που χρησιμοποιούνται για την εναποθήκευση και παραγωγή μεταβολικής ενέργειας στα λιποκύτταρα (υπό την μορφή τριγλυκεριδίων), αλλά επίσης είναι απαραίτητα συστατικά, για την διατήρηση των μεμβρανικών δομών, την σύνθεση των στεροειδών ορμονών και των χολικών οξέων. Η υδρόφοβη συμπεριφορά των λιπιδίων (τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων) αποτελεί το βασικό πρόβλημα για την ελεύθερη κυκλοφορία τους στο πλάσμα. Ο περιορισμός αυτός παρακάμπτεται με την ένωση των λιπιδίων με μια τάξη πρωτεϊνών του πλάσματος που ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες και τον σχηματισμό σωματιδίων λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν μακρομοριακά συμπλέγματα απολιποπρωτεϊνών και λιπιδίων, που παράγονται κυρίως από το ήπαρ και το έντερο, αλλά και άλλους ιστούς του ανθρωπίνου σώματος. Η κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά και ανακατανομή λιπιδίων, που είτε προέρχονται από την διατροφή, είτε συντίθενται ενδογενώς στον οργανισμό.

Οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν στο μέγεθος, την πυκνότητα και την σύσταση σε πρωτεΐνες και λιπίδια (Εικόνα 1). Η σύσταση σε λιπίδια είναι ανάλογη με το μέγεθος και αντιστρόφως ανάλογη με την πυκνότητα του σωματιδίου της λιποπρωτεΐνης. Ο παραδοσιακός τρόπος ταξινόμησης των λιποπρωτεϊνών γίνεται με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους που καθορίζεται από την επίπλευσή τους σε διαβάθμιση διαλύματος βρωμιούχου καλίου μετά από υπερφυγοκέντρηση (Εικόνα 1) (1-3). Έτσι οι λιποπρωτεΐνες διαχωρίζονται σε 5 κύριες τάξεις που ξεκινώντας από την μεγαλύτερη σε μέγεθος είναι οι εξής: 1) χυλομικρά, 2) λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), 3) λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL), 4) λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) και 5) λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Η επί της % σύσταση σε λιπίδια ελλαττώνεται και η επί της % σύσταση σε πρωτεΐνες αυξάνεται πηγαίνοντας από τα χυλομικρά στην HDL. Κάθε τάξη εμφανίζει ετερογένεια στο μέγεθος και στην σύσταση και με την σειρά της υποδιαιρείται σε διάφορους υποπληθυσμούς.

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών αποτελεί ένα πολύπλοκο βιολογικό μονοπάτι και παριστάνεται διαγραμματικά στην εικόνα 2 (1, 2). Το ήπαρ εκκρίνει VLDL και νεοσυντεθείσα HDL (nascent HDL), ενώ το έντερο εκκρίνει χυλομικρά και σε λιγότερα ποσά VLDL, που περιέχουν τα τριγλυκερίδια και άλλα λιπίδια της διατροφής. Μετά την σύνθεσή τους οι νεοσυντεθείσες λιποπρωτεΐνες στο πλάσμα υφίστανται εκτενείς

Εικόνα 1: Σχηματική παρουσίαση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος του ανθρώπου

ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ



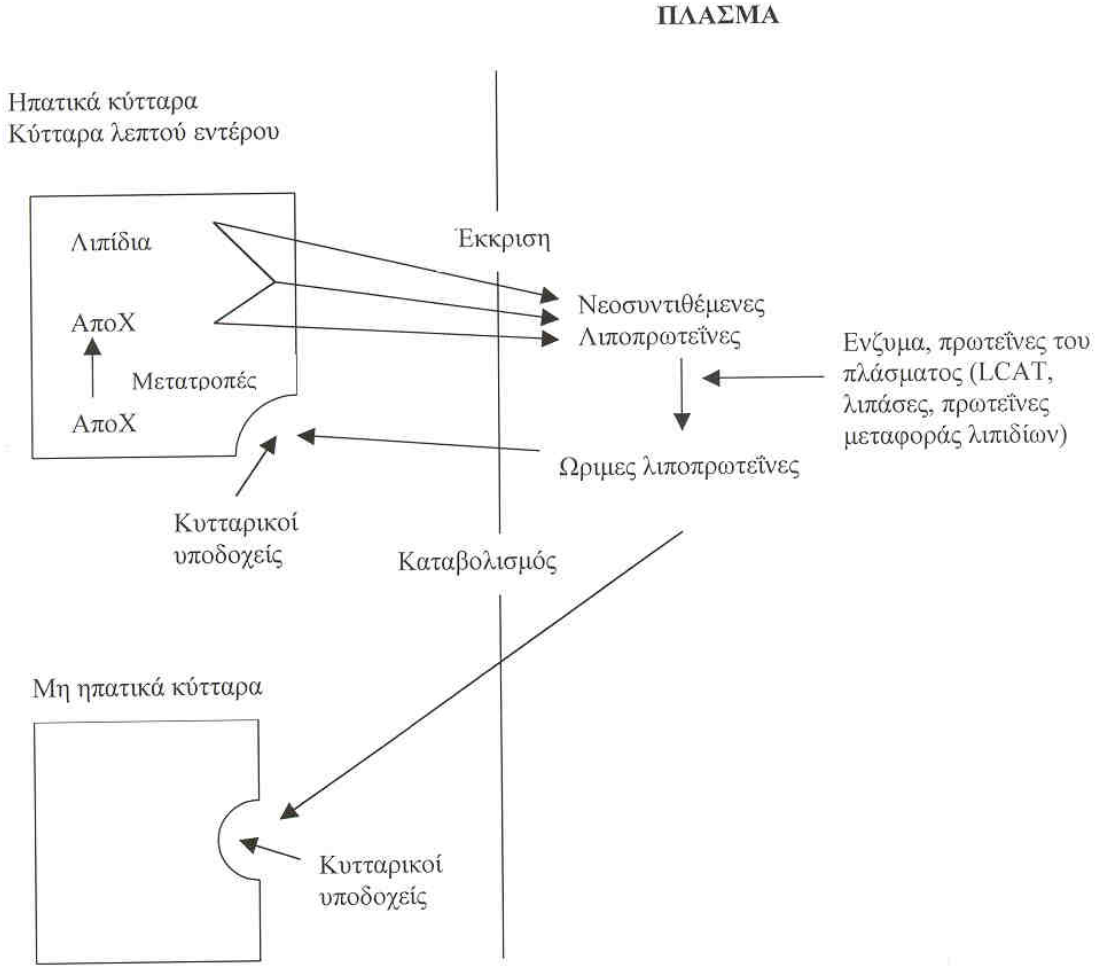
Πυκνότητα (g/ml)	<0.94	0.94 -1.006	1.006 –1.019	1.019-1.063	1.063-1.125	1.125-1.21
Διάμετρος (Å)	750-12000	300-700	250-350	180-300	~88-120	~72-88
Μοριακό Βάρος (KDa)	~400.000	10-80.000	5-10.000	2.300	175-360	
Σύσταση (% βάρους)						
Τριγλυκερίδια	90	65		3	2	
Εστερ. χοληστερόλης	2	10		50	20	
Φωσφολιπίδια	6	15		21	25	
Χοληστερόλη	1	3		6	3	
Πρωτεΐνες	<1	7		20	50	
Κύριες	AI, AIV, B-48 CI, CIII, E	B-100, E, CI, CII, CIII	B-100, E	B-100	AI, AII, E	
Δευτερεύουσες	A-II, CII	A-I, A-II, A-IV	CI, CII, CIII	CI, CII, CIII, E	CI, CII, CIII, D, J	
Πηγή	Έντερο	Ήπαρ	VLDL	VLDL/IDL	Ήπαρ/Εντερο	

τροποποιήσεις. Τέτοιες τροποποιήσεις αφορούν την μεταφορά ή ανταλλαγή λιπιδίων και αποπρωτεϊνών μεταξύ των διαφόρων λιποπρωτεϊνών, καθώς και ενζυματικές τροποποιήσεις, μέσω της δράσης των ενζύμων Ακυλοτρανσφεράσης της Λεκιθίνης-Χοληστερόλης, (LCAT), λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), ηπατικής λιπάσης των τριγλυκεριδίων (HTGL), πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP) και πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP). Αποτέλεσμα αυτών των μετατροπών είναι ο σχηματισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, που είναι σφαιρικές όπως οι VLDL, LDL και HDL (1, 4). Συγκεκριμένες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τα υπολλείμματα τους (remnants) αναγνωρίζονται από κυτταρικούς υποδοχείς και μεταφέρονται στο ήπαρ ή ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού σε άλλα κύτταρα-στόχους. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η χρήση των HDL και LDL που κυκλοφορούν στο πλάσμα καθορίζεται από τις κυτταρικές ανάγκες και η συνδυασμένη χρήση τους συμβάλλει στην ομοιόσταση της χοληστερόλης (5).

Στη συνέχεια αναφέρονται τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των διαφόρων τάξεων λιποπρωτεϊνών. Τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τα λιγότερο πυκνά (πυκνότητα<0.94 gr/cm_3), λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε τριγλυκερίδια και της χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη (<2%). Η κύρια πρωτεΐνη των χυλομικρών είναι η αποB-48. Τα χυλομικρά επίσης περιέχουν πρωτεΐνες αποA-I, αποA-II, αποA-IV και αποC's. Τα χυλομικρά συντίθενται από το έντερο και συμμετέχουν στην μεταφορά των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης της διατροφής, από το έντερο σε μη-ηπατικούς ιστούς για χρήση των λιπαρών οξέων για την παραγωγή ενέργειας, ή αποθήκευση σε λιποκύτταρα. Στο πλάσμα τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών υδρολύονται από ένζυμα, όπως είναι η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), που είναι προσκολλημένη στην επιφάνεια των ενδοθηλίων των τριχοειδών αγγείων. Τα υπολλείματα της υδρόλυσης ονομάζονται υπολλείμματα χυλομικρών (chylomicron remnants) και είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης, και σε πρωτεΐνες αποE και αποB-48. Στη συνέχεια τα υπολλείμματα των χυλομικρών απομακρύνονται πολύ γρήγορα από την κυκλοφορία μέσω του ήπατος με την βοήθεια υποδοχέων που αναγνωρίζουν την αποE. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μεταφορά και η ανακατανομή της χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων που προέρχονται από την διατροφή σε κύτταρα-στόχους (2).

Οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας, (VLDL), είναι πολύ πλούσιες σε τριγλυκερίδια που συντίθενται από το ήπαρ και μεταφέρουν τα ενδογενώς συντιθέμενα τριγλυκερίδια και χοληστερόλη από το ήπαρ σε περιφερικούς ιστούς. Η κύρια πρωτεΐνη

Εικόνα 2: Απλοποιημένη παρουσίαση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, που περιλαμβάνει την βιοσύνθεση, τον σχηματισμό, την έκκριση, τις τροποποιήσεις και τον καταβολισμό των απολιποπρωτεϊνών και των λιποπρωτεϊνών από το ήπαρ και εξω-ηπατικούς ιστούς. Το ήπαρ και το λεπτό έντερο είναι οι κύριες θέσεις σύνθεσης των απολιποπρωτεϊνών και σχηματισμού των σωματιδίων των λιποπρωτεϊνών. Οι νεοσυντεθείσες λιποπρωτεΐνες που εισέρχονται στην κυκλοφορία τροποποιούνται από ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος ή της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι τροποποιημένες (ώριμες) λιποπρωτεΐνες αναγνωρίζονται από υποδοχείς των ηπατικών ή εξω-ηπατικών κυττάρων και εισέρχονται στα ανάλογα κύτταρα όπου και καταβολίζονται απελευθερώνοντας χοληστερόλη.


ΠΛΑΣΜΑ
Ηπατικά κύτταρα
Κύτταρα λεπτού εντέρου
Λιπίδια
ΑποΧ
Μετατροπές
ΑποΧ
Έκκριση
Νεοσυντιθέμενες
Λιποπρωτεΐνες
Ενζυμα, πρωτεΐνες του πλάσματος (LCAT, λιπάσες, πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων)
Ωριμες λιποπρωτεΐνες
Κυτταρικοί υποδοχείς
Καταβολισμός
Μη ηπατικά κύτταρα
Κυτταρικοί υποδοχείς

της VLDL είναι η αποΒ-100. Η VLDL επίσης έχει μικρά ποσά αποCII, αποCIII και αποΕ (Εικόνα 1). Η είσοδος των VLDL στην κυκλοφορία έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από την λιποπρωτεϊνική λιπάση που είναι προσκολλημένη στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων, και την δημιουργία IDL και άλλων υπολλειμμάτων λιποπρωτεϊνών, με αντίστοιχο τρόπο όπως έχει περιγραφεί για τα χυλομικρά. Τα υπολλείμματα των λιποπρωτεϊνών που προέρχονται από την υδρόλυση της VLDL είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης και αποΕ και ακολουθούν δύο δρόμους: Ένα ποσό (60%) απομακρύνεται από την κυκλοφορία μέσω σύνδεσης με ηπατικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν την αποΕ και το υπόλοιπο μετατρέπεται σε LDL με περαιτέρω υδρόλυση τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων από την ηπατική λιπάση και την λιπάση των τριγλυκεριδίων (HTGL), που βρίσκεται στην επιφάνεια ηπατικών κυττάρων (2, 6).

Οι λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας, (IDL), αποτελούν ενδιάμεσες μορφές στην μετατροπή των VLDL σε LDL, η οποία γίνεται με την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Η περιεκτικότητα των IDL σε τριγλυκερίδια και χοληστερόλη είναι σχετικά μικρότερη από αυτή των VLDL. Μέρος των IDL απομακρύνεται από το ήπαρ (μέσω πρόσδεσης σε ηπατικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν την αποΕ) και το υπόλοιπο μετατρέπεται σε LDL.

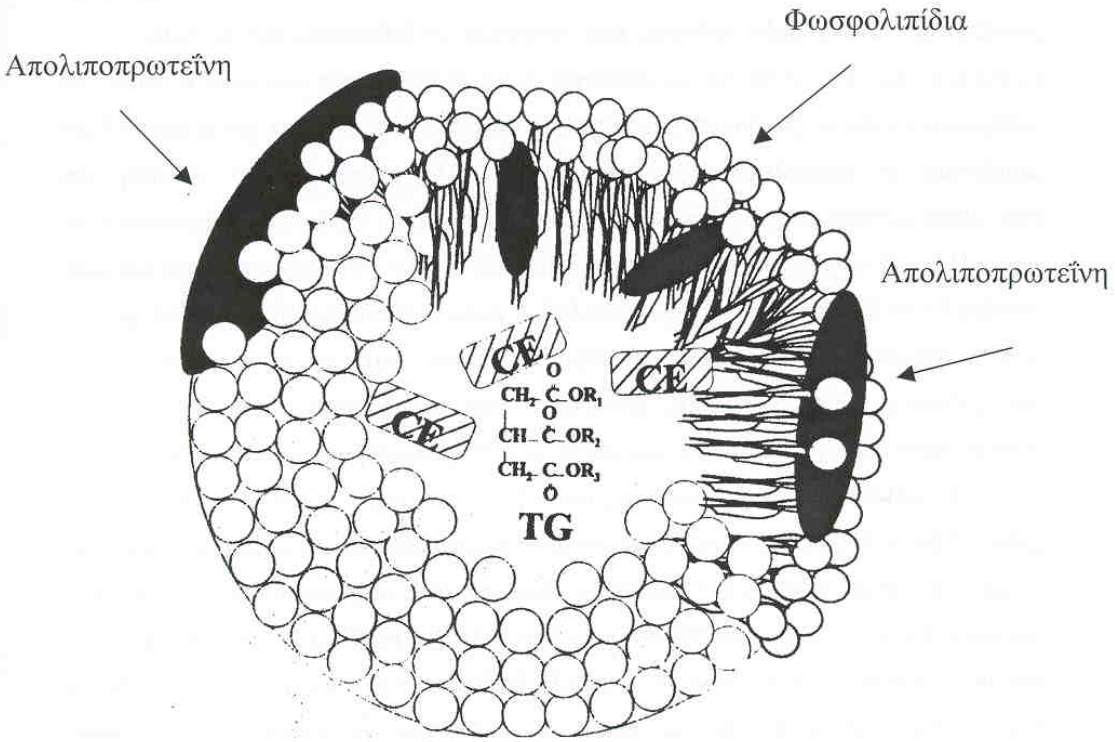
Οι LDL αποτελούν τους κύριους φορείς χοληστερόλης και εστέρων χοληστερόλης στο πλάσμα και περιέχουν πολύ μικρά ποσά τριγλυκεριδίων (Εικόνα 1). Σε ένα φυσιολογικό-υγιές άτομο η LDL περιέχει περίπου το 70% της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος. Περισσότερο από το 40% του βάρους της LDL είναι εστέρες χοληστερόλης, ενώ το ολικό ποσό εστεροποιημένης και μη χοληστερόλης αποτελεί περισσότερο από το μισό του βάρους του σωματιδίου της LDL. Η κύρια πρωτεΐνη της LDL είναι η αποΒ-100. Η LDL προκύπτει κυρίως από την υδρόλυση της VLDL, με ενδιάμεσα προιόντα την IDL αλλά και άλλα υπολλείματα λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες LDL μεταφέρουν την χοληστερόλη σε περιφερικούς ιστούς. Η μεταφορά της χοληστερόλης γίνεται μέσω αναγνώρισης της LDL από τους υποδοχείς της LDL στην επιφάνεια των κυττάρων του ήπατος και των περιφερικών ιστών. Η πρόσληψη της LDL μέσω του υποδοχέα της LDL ρυθμίζει την ενδογενή σύνθεση χοληστερόλης στα κύτταρα. Η συσσώρευση της LDL στο πλάσμα μπορεί να οδηγήσει στην οξείδωση ή την ακυλίωση της και την πρόσληψή της από τους υποδοχείς της τροποποιημένης LDL, που επίσης ονομάζονται υποδοχείς καθαριστές ‘scavenger’ (scavenger receptors), που υπάρχουν σε μονοκύτταρα-μακροφάγα (7). Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται τα αφρώδη κύτταρα

που συναντώνται σε αθηρωματικές αλλοιώσεις.

Οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) έχουν ως κύρια λειτουργία την μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Αποτελούνται από ένα ετερογενή πληθυσμό μικροτέρων και πυκνοτέρων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων σφαιρικού σχήματος, με διάμετρο που κυμαίνεται από 50-120 Å και επιπλέουν σε πυκνότητες 1.063 και 1.21 gr/ml (Εικόνα 1). Τα σωματίδια της HDL περιέχουν περισσότερο % πρωτεΐνη από τις άλλες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, με αναλογία πρωτεΐνης και λιπιδίων περίπου 1:1 κατά βάρος (Εικόνα 1). Η κύρια αποπρωτεΐνη της HDL είναι η αποA-I που συνεισφέρει περίπου 70% στο σύνολο των πρωτεϊνών της HDL. Δεύτερο κύριο συστατικό της HDL είναι η αποA-II που συνυπάρχει με την αποA-I σε ένα υποπληθυσμό της HDL υψηλότερης πυκνότητας (HDL_3) σε μοριακή αναλογία αποA-I: αποA-II, 2: 1 (8). Η HDL μπορεί επίσης να περιέχει τις πρωτεΐνες αποE, αποC-II, αποC-III και αποD (9). Η μέση ποσοστιαία σύσταση των λιπιδίων κατά βάρος των διαφόρων λιποπρωτεϊνών δίνεται στην εικόνα 1. Τα σφαιρικά σωματίδια της HDL, όπως και των άλλων λιποπρωτεϊνών, εμφανίζουν κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα αποτελούνται από ένα υδρόφοβο (εσωτερικό) πυρήνα, που περιέχει μη πολικά ουδέτερα λιπίδια, όπως εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια, και περιβάλλονται από ένα κάλυμμα πολικών συστατικών, όπως πολικές φωσφολιπιδικές κεφαλές, ελεύθερη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες (4, 9, 10, 11). Στην εικόνα 3 φαίνεται η δομή μιας σφαιρικής λιποπρωτεΐνης HDL. Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η σφαιρική HDL προέρχεται από μια πρόδρομη μορφή HDL που αποτελείται από αποA-I και φωσφολιπίδια και έχει δισκοειδές σχήμα (12, 13). Δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (reconstituted HDL, rHDL) μπορούν να σχηματιστούν επίσης σε δοκιμαστικό σωλήνα με ανάμειξη φωσφολιπιδίων και αποA-I. Τα δισκοειδή σωματίδια της HDL έχουν μελετηθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία (12) και χαρακτηρίζονται από την έλλειψη μη πολικού πυρήνα και την διαμόρφωση των πολικών φωσφολιπιδίων σε διπλοστοιβάδα.

Πολλαπλές μελέτες τα τελευταία 25 χρόνια έχουν δείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα HDL συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου (14, 15), ενώ αντίθετα υψηλά επίπεδα HDL στο πλάσμα δρούν προστατευτικά ενάντια στην αθηρωμάτωση και προσδίδουν μακροβιότητα (16, 17). Η βιογένεση της HDL, η δημιουργία των διαφόρων υποπληθυσμών της και ο καταβολισμός της HDL περιγράφονται πιο αναλυτικά στο επόμενο τμήμα της εισαγωγής, ως μέρος των λειτουργιών της κύριας απολιποπρωτεΐνης της HDL, της από A-I καταβολίζονται απελευθερώνοντας χοληστερόλη.

Εικόνα 3: Σχηματική παρουσίαση ενός τυπικού λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου. Τα φωσφολιπίδια της υδρόφιλης επιφάνειας παριστάνονται με κύκλους και γραμμές που προεκτείνονται στο εσωτερικό του σωματιδίου. Τα μόρια της ελεύθερης χοληστερόλης παριστάνονται με ελλειπτικό σχήμα μεταξύ των αλυσίδων των λιπαρών οξέων. Οι εστέρες της χοληστερόλης (CE) στον υδρόφοβο πυρήνα και οι απολιποπρωτεΐνες παριστάνονται με τετράγωνα και ελλειπτικά σχήματα αντίστοιχα. Τα τριγλυκερίδια του πυρήνα σημειώνονται στο κέντρο του σωματιδίου.


Φωσφολιπίδια
Απολιποπρωτεΐνη
Απολιποπρωτεΐνη
CE
CE
CE
TG

Β) Απολιποπρωτεΐνες

Οι απολιποπρωτεΐνες αποτελούν τα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών και έχουν ονομαστεί οι εξής αποA-I, αποA-II, αποA-IV, αποB, αποC-I, αποC-II, αποC-III, αποD και αποE (1, 3).

Όλες οι απολιποπρωτεΐνες περιέχουν ένα πεπτίδιο σήμα (18-27 αμινοξέων), παρόμοιο με αυτό που συναντάται σε άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες (18). Στο πλάσμα οι απολιποπρωτεΐνες εμφανίζονται σε δύο ή περισσότερες ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν στο μέγεθος ή στο φορτίο (2). Οι διαφορές αυτές οφείλονται σε αμινοξικές αντικαταστάσεις αμινοξέων (πολυμορφισμός) ή μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν πρωτεόλυση, γλυκοσυλίωση, απαμίνωση και ακυλίωση (2, 4). Η κύρια λειτουργία των απολιποπρωτεϊνών είναι η διαλυτοποίηση και η μεταφορά των λιπιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται με την ύπαρξη υδροφόβων και υδροφίλων περιοχών στις λιποπρωτεΐνες. Οι υδρόφοβες περιοχές συνδέονται με τις υδρόφοβες αλυσίδες των λιπαρών οξέων ή της χοληστερόλης ενώ οι υδρόφιλες περιοχές των απολιποπρωτεϊνών είναι εκτεθειμένες στο υδατικό διάλυμα (Εικόνα 3). Η αποA-I, και σε λιγότερο βαθμό οι αποA-IV, αποC-II και αποE, ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT (19, 20). Η αποA-I επίσης αναγνωρίζεται και δεσμεύεται στον υποδοχέα καθαριστή (‘scavenger’) τάξης B, τύπου I (scavenger receptor B-I, SR-BI) (21, 22), ενώ οι αποB-100 και αποE αναγνωρίζονται και προσδένονται στον υποδοχέα της LDL (LDLR) (2). Η αποE επίσης αναγνωρίζεται και προσδένεται σε άλλους υποδοχείς όπως ο υποδοχέας LRP (LDL Receptor Related Protein), ο υποδοχέας της VLDL (VLDLR) και υποδοχέας-2 της VLDL (apoE receptor-2) (2, 23). Η αποC-II επίσης αποτελεί ενεργοποιητή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (24).

Στη συνέχεια συνοψίζονται οι υπάρχουσες γνώσεις για την απολιποπρωτεΐνη A-I, στην μελέτη της οποίας έχει βασιστεί η παρούσα διατριβή.

2) ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗ Α-Ι

Α) Σημασία της αποΑ-Ι

Η αποΑ-Ι, αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL και παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά και την ομοιόσταση της χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων. Η αποΑ-Ι απαιτείται για τον σχηματισμό των σωματιδίων της HDL, την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT (19, 25), την σύνδεση της HDL με τον υποδοχέα της SR-BI και πιθανόν με άλλους κυτταρικούς υποδοχείς (21, 26). Η αποΑ-Ι, σαν συστατικό της HDL και της πρε-β HDL προάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα (27, 28), μια διαδικασία που οδηγεί στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερειακούς ιστούς στο ήπαρ.

Ένας μεγάλος αριθμός από επιδημιολογικές μελέτες σε πληθυσμούς έχει δείξει ότι η συγκέντρωση της HDL ή της αποΑ-Ι του πλάσματος συσχετίζονται αντίστροφα με την πιθανότητα ανάπτυξης της στεφανιαίας νόσου (29, 30). Οι μειωμένες συγκεντρώσεις της HDL και της αποΑ-Ι συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και πρόωρη αθηρωμάτωση (31, 32). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της HDL του πλάσματος και της αθηρωμάτωσης δεν παρατηρείται σε όλες τις διαταραχές που έχουν μειωμένα επίπεδα HDL και αποΑ-Ι, παραδείγματος χάριν έχουν περιγραφεί περιπτώσεις φυσικών μεταλλάξεων της αποΑ-Ι οι οποίες οδηγούν σε σοβαρή μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος, αλλά οι φορείς δεν εμφανίζουν κίνδυνο ανάπτυξης πρόωρης στεφανιαίας νόσου (33, 34).

Οι προστατευτικές επιδράσεις της HDL και της αποΑ-Ι ενάντια στην αθηρωμάτωση έχουν μελετηθεί και πιστοποιηθεί και με μελέτες σε ζωντανούς οργανισμούς (in vivo). Παραδείγματος χάριν διαγονιδιακά ποντίκια ή κουνέλια που υπερεκφράζουν το γονίδιο της αποΑ-Ι του ανθρώπου (35, 36) ή κουνέλια που έχουν ενεθεί με HDL ή αποΑ-Ι (37), προστατεύονται από την ανάπτυξη αθηρωματικών αλλοιώσεων. Παραδόξως, η απενεργοποίηση του γονιδίου της αποΑ-Ι, σε διαγονιδιακά ποντίκια, δεν μπορεί από μόνη της να προκαλέσει αθηρωμάτωση (38). Όμως η ταυτόχρονη απενεργοποίηση του αποΑ-Ι, και η υπερέκφραση του γονιδίου αποΒ (39), οδηγεί στην ανάπτυξη μεγαλύτερων αθηρωματικών αλλοιώσεων, σε σύγκριση με ποντίκια που υπερεκφράζουν το αποΒ, αλλά διατηρούν το γονίδιο της αποΑ-Ι.

Β) Το γονίδιο της αποΑ-Ι

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου της αποΑ-Ι έχει γίνει από το 1983 (40). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία δείχνει ότι το γονίδιο έχει μέγεθος 1863 ζεύγη βάσεων (bp) και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια. Το τέταρτο εξόνιο κωδικοποιεί για τα 200 από τα 249 αμινοξέα (που αποτελούν το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αποΑ-Ι). Μελέτες χρωμοσωμικής χαρτογράφησης έδειξαν ότι το γονίδιο της αποΑ-Ι του ανθρώπου βρίσκεται πολύ κοντά στα γονίδια αποC-III και αποΑ-IV, στο μακρύ άκρο του χρωμοσώματος 11 (41, 42, 43). Το γονίδιο της αποΑ-Ι βρίσκεται 2.5 Kb στο 3΄ του γονιδίου της αποC-III και 7.5 Kb στο 5΄ του γονιδίου της αποΑ-IV. Το γονίδιο της αποC-III βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων της αποΑ-IV και η κατεύθυνση της μεταγραφής των γονιδίων αποΑ-Ι και αποΑ-IV είναι αντίθετη από αυτή του αποC-III. Στην εικόνα 4 φαίνεται το σύμπλεγμα των γονιδίων αποΑ-Ι, αποC-III και αποΑ-IV του ανθρώπου.

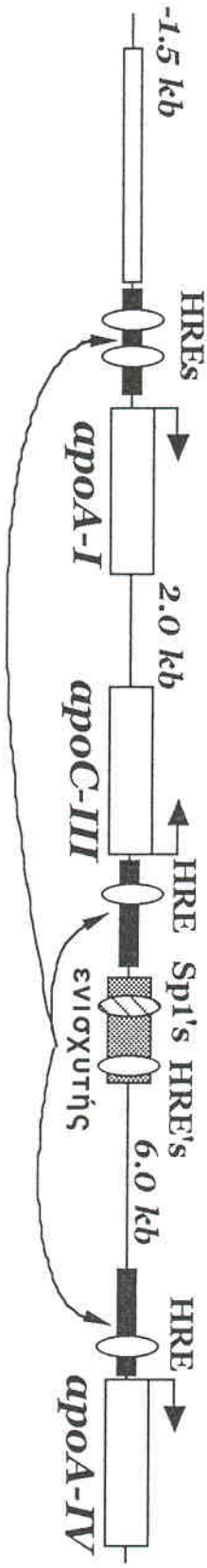
Γ) Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της αποΑ-Ι

Το γονίδιο της αποΑ-Ι εκφράζεται στο ήπαρ και το έντερο και η μεταγραφή του ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο στους δύο αυτούς ιστούς. Η ηπατική έκφραση ελέγχεται από 3 ρυθμιστικά στοιχεία, Β (-128 ως –77), C (-175 ως –148) και D (-220 ως –190) του υποκινητή της αποΑ-Ι και ενισχύεται από ένα ενισχυτή που βρίσκεται στην περιοχή –800 έως –500 του υποκινητή του γονιδίου της αποC-III. Τα στοιχεία Β και D περιέχουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (44). Πειράματα σύνδεσης στο DNA και πειράματα ανταγωνισμού έδειξαν ότι τα στοιχεία Β και D συνδέονται με τον ηπατικό μεταγραφικό παράγοντα-4 (HNF4), καθώς επίσης και άλλους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς (orphan receptors), και ομοδιμερή ή ετεροδιμερή πυρηνικών υποδοχέων που ενεργοποιούνται από μικρά μόρια δεσμευτών, όπως τα ρετινοειδή και η θυροειδής ορμόνη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υποδοχείς RXRα, RARα, T_3Rβ (45-47). Το στοιχείο C αναγνωρίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο C/EBP και ένα παράγοντα που έχει ονομασθεί A-ICI (44, 48).

Η περιοχή του υποκινητή της αποΑ-Ι από –1500 ως –5, έχει χαμηλά επίπεδα ενεργότητας σε κύτταρα εντέρου. Εντούτοις η ενεργότητα αυξάνεται σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά της ενεργότητας των ηπατικών κυττάρων, όταν ο κοντινός υποκινητής (-255 ως –5) συνδεθεί με την ρυθμιστική περιοχή –500 ως –890 του αποC-III, παρουσία HNF4 (48). Αυτή η μακρινή ρυθμιστική περιοχή του αποC-III περιέχει τα ρυθμιστικά στοιχεία F, G, H, I και J και έχει 3 θέσεις σύνδεσης για τον παράγοντα SP1,

μια θέση σύνδεσης για τον HNF4 και άλλες θέσεις σύνδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη. Τα υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η έκφραση του αποA-I σε κύτταρα εντέρου επιτυγχάνεται με συνεργατική αλληλεπίδραση μεταξύ του HNF4 που προσδένεται στον υποκινητή της αποA-I και του ενισχυτή της αποC-III και του μεταγραφικού παράγοντα SP1, που συνδέεται στον ενισχυτή της αποC-III. Τέλος πρόσφατα έγιναν μελέτες της έκφρασης του αποA-I σε διαγονιδιακά ποντίκια, που φέρουν φυσικού τύπου υποκινητές του ανθρώπινου γονιδιακού συμπλέγματος αποA-I και αποC-III, και υποκινητές μεταλλαγμένους στα στοιχεία που προσδένονται οι πυρηνικοί υποδοχείς. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι θέσεις σύνδεσης του HNF4 και του SP1 στον ενισχυτή είναι απαραίτητες για την έκφραση των αποA-I και αποC-III στο έντερο, και επίσης στην ενίσχυση της ηπατικής έκφρασης. Επίσης βρέθηκε ότι ο κοντινός υποκινητής του αποA-I, ή ο ενισχυτής του αποC-III μπορούν να συμβάλλουν ανεξάρτητα στην έκφραση του γονιδίου της αποA-I στο ήπαρ και στο έντερο (49).

Εικόνα 4: Σχηματική παρουσίαση του συμπλέγματος των γονιδίων αποA-I/αποC-III/αποA-IV του ανθρώπου. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών. Τα μεγαλύτερα βέλη που ξεκινούν από τον ενισχυτή της γονιδίου αποC-III δείχνουν την επίδραση του ενισχυτή του γονιδίου της αποC-III στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων αποA-I και αποA-IV.
HRE: στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone Response Elements)


-1.5 kb
HREs
apoA-I
2.0 kb
apoC-III
HRE
Sp1's
HRE's
ενισχυτής
6.0 kb
HRE
apoA-IV

Δ) Βιοσύνθεση της αποA-I

Η αποA-I στον άνθρωπο και στα περισσότερα είδη των θηλαστικών, με εξαίρεση το κουνέλι, συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και το λεπτό έντερο (2, 50). Τα επίπεδα του mRNA της αποA-I στους ιστούς ρυθμίζονται από ορμόνες και τη διατροφή, και ελέγχονται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα mRNA μπορούν να αυξηθούν κατά την αναγέννηση και την κήρωση του ήπατος (51). Το mRNA της αποA-I έχει μέγεθος 893 νουκλεοτίδια και κωδικοποιεί για μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 267 αμινοξέων, που καλείται πρε-προ-αποA-I (52). Κατά την διάρκεια της μετάφρασης μέσα στο κύτταρο πραγματοποιείται το κόψιμο του πρε-προπεπτιδίου, που αποτελείται από 18 αμινοξέα, από την πεπτιδάση σήματος (signal peptidase). Έχει προταθεί ότι η νεοσυντεθείσα αποA-I υφίσταται ενδοκυτταρικές τροποποιήσεις όπως ακυλίωση με λιπαρό οξύ και φωσφορυλίωση στη σερίνη στη θέση 201. Οι τροποποιήσεις αυτές δεν έχουν ανιχνευθεί στην αποA-I που υπάρχει στο πλάσμα. Ακολουθεί έκκριση της αποA-I και πρωτεολυτική πέψη του προπεπτιδίου των 6 αμινοξέων (53), από μια ενδο-πεπτιδάση, για να προκύψει τελικά η ώριμη μορφή της αποA-I που απαντάται στο πλάσμα και αποτελείται από 243 αμινοξέα (Εικόνα 5). Το πρωτεολυτικό ένζυμο που υδρολύει το προπεπτίδιο της αποA-I δεν έχει προσδιορισθεί. Το ένζυμο αυτό αναστέλλεται από EDTA και αντιδραστήρια θειόλης και πιθανώς να ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών. Η παρουσία ενός διπεπτιδίου γλουταμίνης (Gln-Gln) στο καρβοξυτελικό άκρο του προπεπτιδίου έχει ως αποτέλεσμα η προ-αποA-I να μην υφίσταται ενδοκυττάρια πρωτεόλυση (40, 54). Αυτό το χαρακτηριστικό διακρίνει το προπεπτίδιο της αποA-I από τα υπόλοιπα προπεπτίδια των σπονδυλωτών, τα οποία έχουν δύο βασικά αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο που υφίστανται πρωτεόλυση κατά την έκκριση στα εκκριτικά κυστίδια (55). Η αλληλουχία του ωρίμου τμήματος της πρωτεΐνης που εξάγεται από την αλληλουχία του DNA είναι όμοια με αυτήν που καθορίστηκε με μεθόδους ανάλυσης πρωτεϊνικής δομής (56, 57).

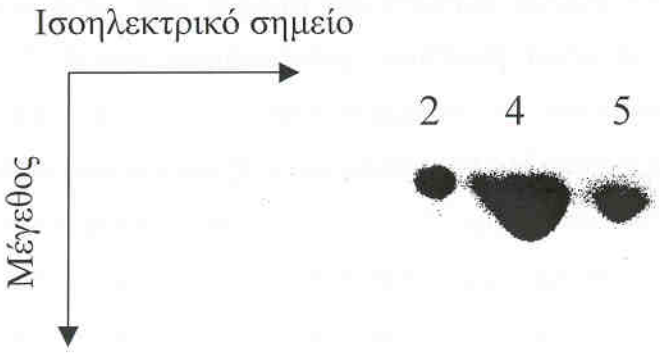
Η αποA-I του πλάσματος αποτελείται από μια σειρά ισομορφών, που ονομάσθηκαν A-I_2 μέχρι A-I_5 (54) (Εικόνα 6). Η μορφή προ-αποA-I έχει ταυτοποιηθεί ως η A-I_2, και είναι η πιο βασική (θετικά φορτισμένη) από τις ισομορφές του πλάσματος. Στους ανθρώπους η προαποA-I αποτελεί λιγότερο από 4% της ολικής μάζας της αποA-I του πλάσματος και χαρακτηρίζεται από ταχύ καταβολισμό. Η A-I_4 αποτελεί την ώριμη μορφή της αποA-I και αποτελεί το 80-85 % της ολικής μάζας της αποA-I στο πλάσμα. Οι μορφές A-I_5 και A-I_6 (Εικόνα 6) είναι πιο όξινες από την A-I_4 και αποτελούν δευτερεύουσες ισομορφές της κύριας ώριμης αποA-I, οι οποίες προκύπτουν από

Εικόνα 5: Σχηματική παρουσίαση της σύνθεσης και των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών τροποποιήσεων της αποΑ-Ι

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-Ι

Εικόνα 6: Απεικόνιση των ισομορφών της αποΑ-Ι του πλάσματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μετά από ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.

Ισομορφές της αποA-I του πλάσματος



Μορφή 2: προ-αποA-I

Μορφή 4: ώριμη αποA-I

Μορφή 5: προϊόν απαμίνωσης της ώριμης αποA-I

διαδοχική απαμίνωση της A-I_4. Η αποA-I που συντίθεται από κύτταρα αποτελείται κυρίως από την ισομορφή A-I_2 (58).

Ε) Δομή της αποA-I

Η μελέτη της αμινοξικής (59, 60) και της νουκλεοτιδικής (18, 40, 52) αλληλουχίας της αποA-I έδειξε ότι τόσο η πρωτεΐνη όσο και το γονίδιο αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες. Όλες οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες κωδικοποιούνται στην περιοχή του τέταρτου εξόνιου του γονιδίου (αμινοξέα 44-241), (Εικόνα 7). Η επαναλαμβανόμενη πρωτεϊνική ακολουθία αποτελείται από 22 αμινοξέα και περιέχει δύο συμμετρικά κομμάτια 11 καταλοίπων με παρόμοιες διατάξεις φορτισμένων και υδρόφοβων αμινοξέων (59). Η αποA-I περιέχει οκτώ επαναλήψεις των 22 αμινοξέων και δύο επαναλήψεις των 11 αμινοξέων (18), όπως φαίνεται στην εικόνα 7. Οι επαναλήψεις των 11 αμινοξέων έχουν χωριστεί σε δύο ομάδες, Α και Β (18, 61). Η προσεκτική μελέτη της αλληλουχίας των αμινοξέων στις δύο ομάδες (Α και Β) φανερώνει τα ακόλουθα κοινά χαρακτηριστικά: Το αμινοξύ προλίνη, που όπως είναι γνωστό συναντάται στο τέλος των δομών α-ελίκων στις πρωτεΐνες συνήθως επαναλαμβάνεται κάθε 22 αμινοξέα και βρίσκεται στην αρχή στις 6 από τις 8 επαναλήψεις. Τα υπολλείμματα στις θέσεις 6 και 10 και των δύο ομάδων είναι κυρίως υδρόφοβα αμινοξέα. Επίσης και στις δύο ομάδες οι θέσεις 4 και 5 καταλαμβάνονται κυρίως από όξινα αμινοξέα και η θέση 9 από βασικά αμινοξέα. Πέρα από τις προαναφερθείσες ομοιότητες, οι ακολουθίες Α και Β έχουν και κάποιες βασικές διαφορές: η θέση 2 της ακολουθίας Α καταλαμβάνεται κυρίως από υδρόφοβα αμινοξέα, ενώ στην ακολουθία Β δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο αμινοξύ. Επίσης η θέση 3 στην ακολουθία Β περιλαμβάνει πιο συχνά υδρόφοβα αμινοξέα συγκριτικά με την αντίστοιχη θέση της ακολουθίας Α και τέλος στην θέση 7 της ακολουθίας Β απαντώνται πιο συχνά βασικά αμινοξέα από την αντίστοιχη θέση της ακολουθίας Α.

Οι επαναλήψεις της αποA-I φαίνεται ότι προήλθαν, εξελικτικά, με κατ' ακολουθίαν διπλασιασμό της πρωτογενούς ακολουθίας των 22 υπολλειμμάτων (tandem duplication of primordial 22-mer repeat), οι οποίες με την σειρά τους είναι πιθανώς το αποτέλεσμα του διπλασιασμού μιας πιο πρωτογενούς ακολουθίας 11 υπολλειμάτων. Οι επαναλήψεις των 22 αμινοξέων πιστεύεται ότι, παρουσία φωσφολιπιδίων, αποκτούν διατάξεις αμφιπαθικών α-ελίκων, με πολύ συγκεκριμένη κατανομή πολικών και μη πολικών αμινοξέων. Έτσι οι αμφιπαθικές α-έλικες έχουν δύο φάσεις, μία μη πολική φάση, που μπορεί να ενωθεί με τις υδρόφοβες ομάδες των λιπιδίων του πυρήνα που

συνιστά το σωματίδιο της λιποπρωτεΐνης και μια πολική φάση, που μπορεί να ενωθεί με τις υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων και την υδατική φάση (πλάσμα) (62). Αυτή η ιδιότητα είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των αμφιπαθικών α-ελίκων που ευρίσκονται στις λιποπρωτεΐνες (62, 63). Οι αμφιπαθικές έλικες χωρίζονται σε 3 κατηγορίες που ονομάζονται A, G και Y και συναντώνται και σε άλλες απολιποπρωτεΐνες (αποE (64) και λιποφορίνη (65). Οι έλικες αυτές είναι διαφορετικές από τις έλικες που υπάρχουν στις σφαιρικές πρωτεΐνες. Σύμφωνα με το μοντέλο που έχει προταθεί από τον Segrest (66), η συγγένεια των απολιποπρωτεϊνών για σύνδεση με λιπίδια πιθανόν σχετίζεται με την έκταση στην οποία οι α-έλικες τους συμφωνούν με το μοντέλο της τάξης A. Στις αμφιπαθικές έλικες της τάξης A, τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα βρίσκονται στο κέντρο της πολικής φάσης και τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα βρίσκονται στην περιφέρεια της φάσης αυτής. Έχει προταθεί ότι αυτά τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όταν ενωθούν με φωσφολιπίδια, μετακινούνται προς την πολική φάση της έλικας και οι φορτισμένες τους ομάδες εισχωρούν στο υδατικό μέσο. Έτσι βασικά όλη η αφόρτιστη επιφάνεια των αμφιπαθικών ελίκων μπορεί να καλυφθεί μέσα στο υδρόφοβο εσωτερικό της φωσφολιπιδικής μονοστοιβάδας (66). Στην έλικα τάξης G τα θετικά και τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα της πολικής φάσης ακολουθούν τυχαία κατανομή, ενώ στην έλικα τάξης Y παρατηρείται ότι υπάρχει κατανομή σε ξεχωριστές περιοχές (clustering) των θετικά και των αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων στην πολική φάση της έλικας. Οι περισσότερες από τις επαναλήψεις των 22 αμινοξέων της πρωτείνης αποA-I ανήκουν σε αμφιπαθικές έλικες A τάξης, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.

Μελέτες κυκλικού διχροϊσμού σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) που περιέχουν αποA-I και φωσφολιπίδια και χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων οδήγησαν τους Nolte και Atkinson (61) στην πρόβλεψη μοντέλου για την δευτεροταγή δομή της αποA-I. Το μοντέλο αυτό δείχνει ότι η κεντρική περιοχή (αμινοξέα 44-243) της αποA-I περιέχει αποκλειστικά α-έλικες που δείχνουν ποικίλο αμφιπαθικό χαρακτήρα και οι οποίες διακόπτονται από στροφές, στις θέσεις συναντάται το αμινοξύ προλίνη. Η αμινοτελική περιοχή των 44 αμινοξέων αποτελείται από μια μικρή έλικα, από περιοχές τυχαίου σπειράματος και β-στροφές. Οι έλικες της αποA-I αποτελούνται από πολλές επαναλήψεις A/B, και μπορεί να διατάσσονται με αντιπαράλληλο τρόπο για τον σχηματισμό δομής δεματιού έλικας (helical bundle structure). Η εικόνα 8 παριστάνει το μοντέλο της δευτεροταγούς δομής της αποA-I κατά Nolte και Atkinson (61), τροποποιημένο κατάλληλα ώστε να περιέχει τα πρόσφατα δεδομένα, που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της δομής της αποA-I, που αποκτήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων

X, και συζητείται λεπτομερέστερα κατωτέρω.

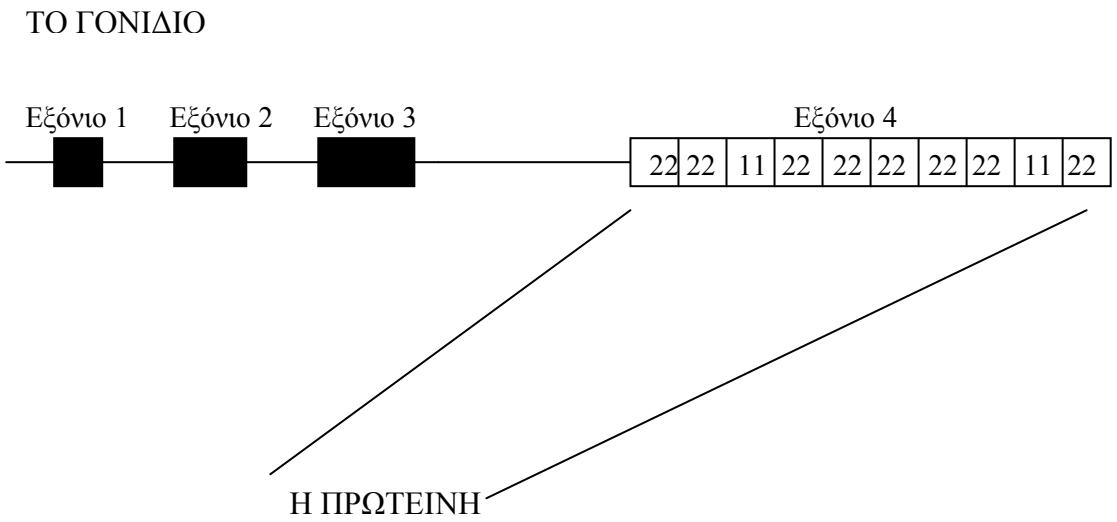
Πρόσφατα έγιναν μελέτες των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της αποA-I, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της δομής της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I (αποA-I σε διάλυμα). Οι μελέτες συμφωνούν στο ότι η μονομερής αποA-I σε διάλυμα είναι χαλαρά διπλωμένη (loosely folded) (67, 68) και πιθανώς να έχει την δομή δεματιού α-ελίκων ελλειπτικού σχήματος (67, 69).

Την τελευταία πενταετία έγιναν πολλές μελέτες μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με σκοπό την πρόβλεψη της στερεοδιαμόρφωσης (conformation) της αποA-I σε υδατικό διάλυμα, ή σε σωματίδια rHDL, όπου η αποA-I είναι ενωμένη με φωσφολιπίδια στην επιφάνεια των δισκοειδών σωματιδίων. Σημαντικότατη συνεισφορά στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας της αποA-I και της HDL αποτέλεσε ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της αποA-I, σε χαμηλή διακριτική ικανότητα (4 Å) με κρυσταλλογραφία ακτίνων X , από τους Borhani et al (70). Η μορφή της αποA-I που ανελύθη περιέχει τα αμινοξέα 44-243 του τετάρτου εξονίου. Φυσικοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η αποA-I: Δ(1-43) που εκρυσταλλώθη έχει παρόμοια % σύσταση σε α-έλικες τόσο σε υδατικό διάλυμα, υπό την μορφή αποπρωτεΐνης, όσο και όταν βρίσκεται ενωμένη με φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, υπό την μορφή δισκοειδών σωματιδίων rHDL (71). Το μόριο αποτελείται σχεδόν εξ'ολοκλήρου από μια σχεδόν ψευτο-συνεχή αμφιπαθική α-έλικα που διακόπτεται από μικρές στροφές (kinks) σε κανονικά διαστήματα όπου υπάρχουν υπολλείμματα προλινών. Το μόριο αποκτά σχήμα παρόμοιο με πέταλο αλόγου διαστάσεων 125 x 80 x 40 Å. Στην ασύμμετρη μονάδα του κρυστάλλου υπάρχουν 4 μόρια αποA-I που έχουν διαμόρφωση A/B και C/D και σχηματίζουν δύο αντιπαράλληλα διμερή. Τα διμερή ενώνονται μέσω των υδροφοβικών επιφανειών τους για να σχηματίσουν ένα τετραμερές. Οι έλικες στο διμερές A/B ζευγαρώνουν με αντιπαράλληλο τρόπο ως εξής: A10/B10, A3/B7 και A7/B3, A2/B7-B8 και A7-A8/B2, A1/B8-B9 και A8-A9/B1. Η κρυσταλλική δομή της αποA-I: Δ(1-43) σε διάλυμα φαίνεται στην εικόνα 9. Οι μέσες συντεταγμένες φψ των επαναλαμβανόμενων ελικοειδών περιοχών (με 22 αμινοξέα) προσεγγίζουν τις συντεταγμένες μιας ιδανικής α-έλικας, και η δομή είναι μη επίπεδη. Η δομή της αποA-I σε ελεύθερη μορφή ενδέχεται να μοιάζει με την δομή της αποA-I, όταν είναι συνδεδεμένη με φωσφολιπίδια.

Εντούτοις είναι πιθανό η δομή της αποA-I όταν ενώνεται με λιπίδια σε σωματίδια rHDL να είναι διαφορετική, κυρίως λόγω της επίδρασης των λιπιδίων στην πρωτεϊνική δομή.

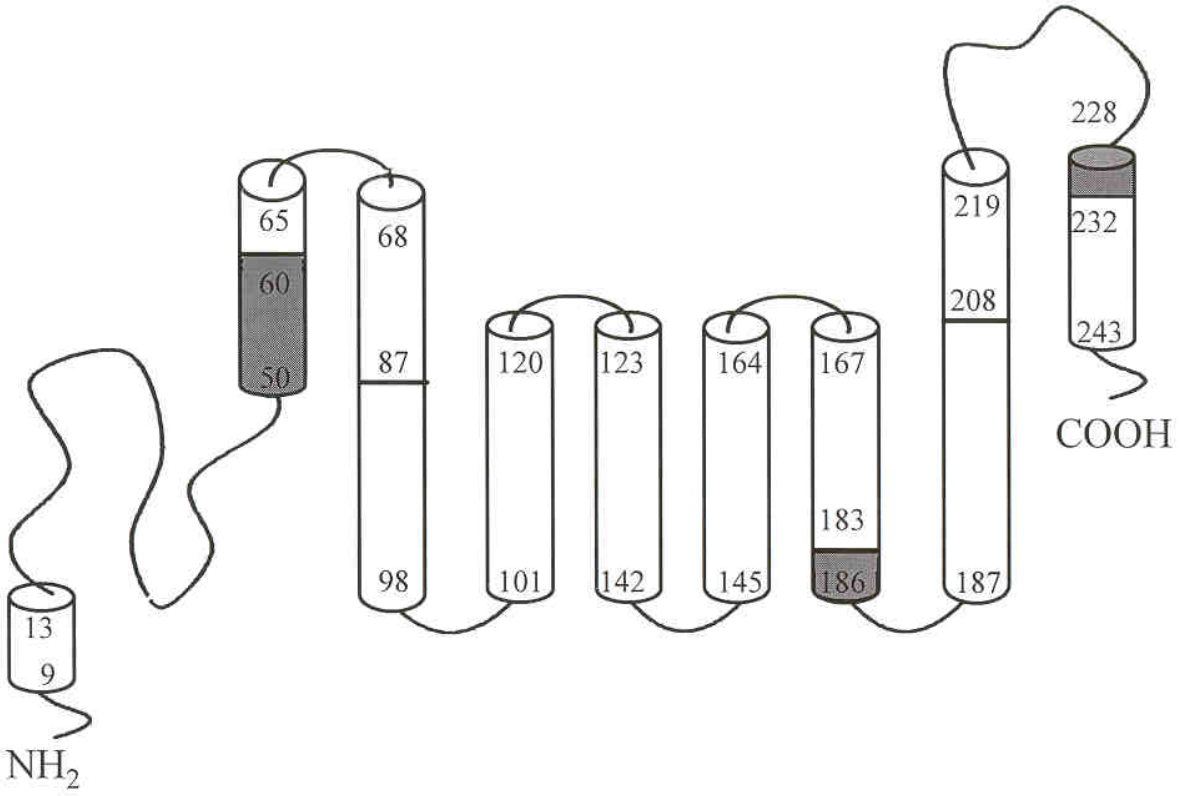
Εικόνα 7: Σχηματική παρουσίαση του γονιδίου της αποΑ-Ι και της αλληλουχίας της πρωτεΐνης αποΑ-Ι. Οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες των 11-αμινοξέων παριστάνονται ως επαναλήψεις τύπου Α και τύπου Β (61)

ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗ Α-Ι



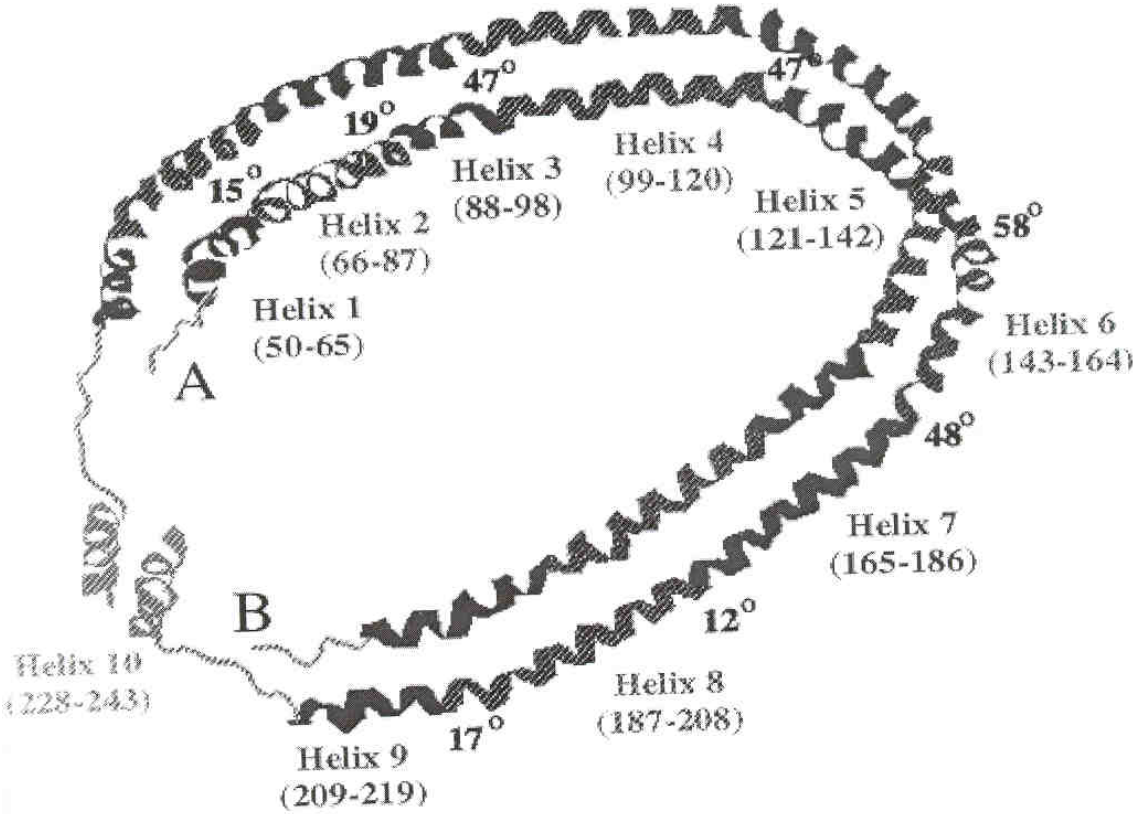
Επανάληψη	Έλικα	Τάξη έλικας	Αμινοξύ	Επανάληψη Α *1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11*	Επανάληψη Β *1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11*	Αμινοξύ
1	1	A	44	L K LL D N W D S V T	S T F S K L R E Q L G	65
2	2	A	66	P V T Q E F W D N L E	K E T E G L R Q E M S	87
3	3	Y			K D L E E V K A K V Q	98
4	4	Y	99	P Y L D D F Q K K W Q	E E M E L Y R Q K V E	120
5	5	A	121	P L R A E L Q E G A R	Q K L H E L Q E K L S	142
6	6	A	143	P L G E E M R D R A R	A H V D A L R T H L A	164
7	7	A	165	P Y S D E L R Q R L A	A R L E A L K E N G G	186
8	8	A	187	A R L A E Y H A K A T	E H L S T L S E K A K	208
9	9	A			P A L E D L R Q G L L	219
10	10	A	220	P V L E S F K V S F L	S A L E E Y T K K L N	241
		Συντηρημένη επανάληψη		**P L A E E L R A R L R**	**A Q L E E L R E R L G**	

Εικόνα 8: Μοντέλο της δευτεροταγούς δομής της αποΑ-Ι, βασισμένο στους Nolte και Atkinson (61) και τροποποιημένο (σκιασμένες περιοχές) με βάση τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα των Borhani et al (70). Οι έλικες 1-9 κατά Nolte και Atkinson έχουν τροποποιηθεί ως εξής: η έλικα 2 γίνεται έλικα 1 (αμινοξέα 50-65). Η έλικα 3 (αμινοξέα 66-98) χωρίζεται σε έλικα 2 (αμινοξέα 66-87) και έλικα 3 (αμινοξέα 87-98). Οι κεντρικές έλικες 4-6 παραμένουν οι ίδιες και αποτελούνται από τα εξής αμινοξέα: έλικα 4 (αμινοξέα 99-120), έλικα 5 (αμινοξέα 121-142), έλικα 6 (αμινοξέα 143-164). Η έλικα 7 επεκτείνεται κατά τρία αμινοξέα (165-186). Η έλικα 8 (αμινοξέα 187-223) χωρίζεται σε έλικα 8 (αμινοξέα 187-209) και έλικα 9 (αμινοξέα 210-219) και η έλικα 9 επεκτείνεται κατά 4 αμινοξέα και γίνεται έλικα 10 (αμινοξέα 228-243).



Ελικα κατά Borhani		1	2, 3	4	5	6	7	8, 9	10
Ελικα κατά Nolte	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Εικόνα 9: Δομή του διμερούς της μορφής αποΑ-Ι: Δ(1-43) σε διάλυμα, με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. **Η εικόνα βασίζεται σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα ακτίνων Χ, σε διακριτική ικανότητα 4 Å. Απεικονίζεται το αντιπαράλληλο ζευγάρωμα των ελίκων των δύο μονομερών της αποΑ-Ι Α και Β. Η εικόνα έχει δανεισθεί από τους Borhani et al (70).**


47°
47°
19°
15°
Helix 3
(88-98)
Helix 4
(99-120)
Helix 5
(121-142)
58°
Helix 2
(66-87)
Helix 1
(50-65)
A
Helix 6
(143-164)
48°
Helix 7
(165-186)
B
12°
Helix 10
(228-243)
Helix 8
(187-208)
17°
Helix 9
(209-219)

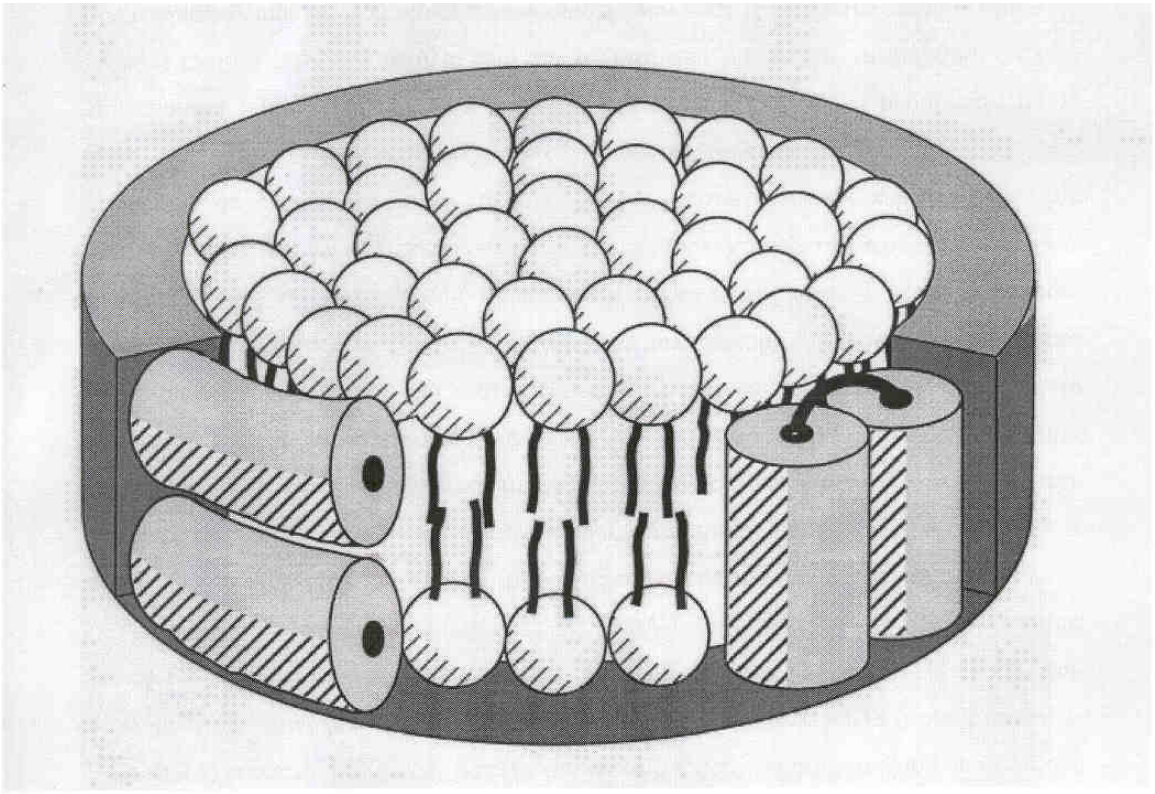
Ι) Δομή της αποA-I σε δισκοειδή σωματίδια HDL

Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα δισκοειδή σωματίδια είναι μικρές μονομεμβρανικές διπλοστοιβάδες διαμέτρου 75 με 110 Å, και περιβάλλονται συνήθως από 2 και μερικές φορές 3 ή 4 μόρια της αποA-I (72, 73). Έχουν προταθεί δύο μοντέλα για την δομή της αποA-I στα δισκοειδή σωματίδια και φαίνονται στην εικόνα 10**.** Σύμφωνα με το μοντέλο ζώνης (belt model), τα μόρια της αποA-I σχηματίζουν συνεχόμενες αμφιπαθικές α-έλικες που είναι παράλληλες στις αλυσίδες λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια του δίσκου (70, 74, 75). Το μοντέλο φράκτη (picket-fence model) προτείνει ότι οι αμφιπαθικές α-έλικες των 22 επαναλήψεων της αποA-I σχηματίζουν αντιπαράλληλες έλικες, οι οποίες αλληλεπιδρούν η μία με την άλλη, και είναι κάθετες στο επίπεδο του δίσκου (76, 77, 78).

Οι Phillips et al (79) πρότειναν ένα λεπτομερές μοντέλο για την διαμόρφωση της αποA-I στα δισκοειδή σωματίδια της rHDL που συμφωνεί με το μοντέλο του φράκτη. Το μοντέλο τοποθετεί τα κέντρα καθεμιάς από τις 16 αντιπαράλληλες α-έλικες σε ένα κύκλο διαμέτρου 88 Å. Ο κύκλος αυτός που σχηματίζεται από 2 μόρια αποA-I, περιφέρειας 276 Å, προβλέπεται να έχει μια μέση απόσταση 17 Å μεταξύ των αντιπαράλληλων α-ελίκων. Η απόσταση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη από την απόσταση των 10 Å που παρατηρείται στις αντιπαράλληλες α-έλικες των σφαιρικών πρωτεϊνών. Είναι πολύ πιθανό το κενό των 7 Å, το οποίο προβλέπεται μεταξύ των ελίκων να εκθέτει τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων στην υδατική φάση και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μη αποδεκτές υψηλές υδροφοβικές ενεργειακές απώλειες.

Τα υπάρχοντα δεδομένα των τελευταίων 3 χρόνων συμφωνούν με το μοντέλο ζώνης ως την πιθανή διαμόρφωση της δομής της αποA-I στα δισκοειδή σωματίδια της HDL (70, 74, 75). Σύμφωνα με το μοντέλο ζώνης οι έλικες της καρβοξυτελικής περιοχής της αποA-I είναι σημαντικές για τον σχηματισμό και τις αλληλεπιδράσεις των διμερών της αποA-I. Η κρυσταλλογραφική δομή της αποA-I, που καθορίστηκε από τους Borhani et al (70) προτείνει ότι η αποA-I μπορεί να συνδεθεί στην HDL ως αντιπαράλληλο διμερές A/B, που τυλίγεται γύρω από την περιφέρεια του δίσκου. Επίσης, πρόσφατες μελέτες εξέτασαν τον σχετικό προσανατολισμό των λιπιδίων και των πρωτεϊνών σε δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν αποA-I και φωσφολιπίδια, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, με χρήση μιας νέας μορφής φασματοσκοπίας (υπέρυθρου πολωμένου φωτός με εσωτερική ανάκλαση) (polarized internal reflection infrared spectroscopy). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η αποA-I των σωματιδίων προσανατολίζεται επιλεκτικά παράλληλα προς την επιφάνεια του δισκοειδούς σωματιδίου (75) και συμφωνεί με το μοντέλο της ζώνης.

Εικόνα 10: Μοντέλο δισκοειδούς λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας. Πιθανοί προσανατολισμοί των αμφιπαθικών ελίκων της αποΑ-Ι σε δισκοειδή σωματίδια της απολιποπρωτεΐνης με φωσφολιπίδια. Στα αριστερά εικονίζεται το μοντέλο της ζώνης (belt model) και στα δεξιά το μοντέλο του φράκτη (picket-fence model).



Οι Segrest et al (74) πρότειναν πρόσφατα ένα λεπτομερές μοντέλο ζώνης που εξηγεί την σύνδεση της αποA-I με φωσφολιπίδια και το σχηματισμό δισκοειδών σωματιδίων. Το μοντέλο βασίζεται στην υπόθεση ότι τα λιπίδια επιβάλλουν σοβαρούς περιορισμούς στην στερεοδιάταξη και τον προσανατολισμό των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με αυτά (66). Με βάση το μοντέλο, δύο μόρια αποA-I περιτυλίγονται (όπως μια ζώνη) γύρω από μια μικρή δισκοειδή διπλοστοιβάδα που αποτελείται από 160 μόρια φωσφολιπιδίων. Η καρβοξυτελική περιοχή του κάθε μονομερούς αποA-I (αμινοξέα 44-243) σχηματίζει ένα δακτύλιο που απαρτίζεται από μια κυρτή, αμφιπαθική α-έλικα που περιέχει κατά μέσο όρο 11/3 αμινοξέα ανά στροφή (3.67), και ονομάζεται α11/3 έλικα. Η έλικα αυτή διαφέρει λίγο από την ιδανική α-έλικα των 3.6 αμινοξέων ανά στροφή. Έχει δειχθεί ότι οι έλικες μπορούν να κυρτώνονται σε περιβάλλοντα που μεταβάλλονται από υψηλότερες προς χαμηλότερες διηλεκτρικές σταθερές. Με αυτό τον τρόπο η ένωση της συνεχόμενης αμφιπαθικής α-έλικας της αποA-I με το δισκοειδές φωσφολιπιδικό σωματίδιο οδηγεί σε αυθόρμητο πακετάρισμα της πρωτεΐνης γύρω από την περιφέρεια του δίσκου και έτσι η υδρόφοβη επιφάνεια προσανατολίζεται προς το εσωτερικό του λιπιδικού δισκοειδούς σωματιδίου. Χρήση μοριακών μοντέλων (molecular modeling) έδειξε ότι η α 11/3 έλικα μπορεί να σχηματίσει ένα δακτυλίδι στο χώρο, που έχει μια επίπεδη επιφάνεια με εσωτερική και εξωτερική διάμετρο 85 Å και 105 Å αντίστοιχα, και μια συνεχιζόμενη κυρτή εσωτερική υδρόφοβη επιφάνεια (80).

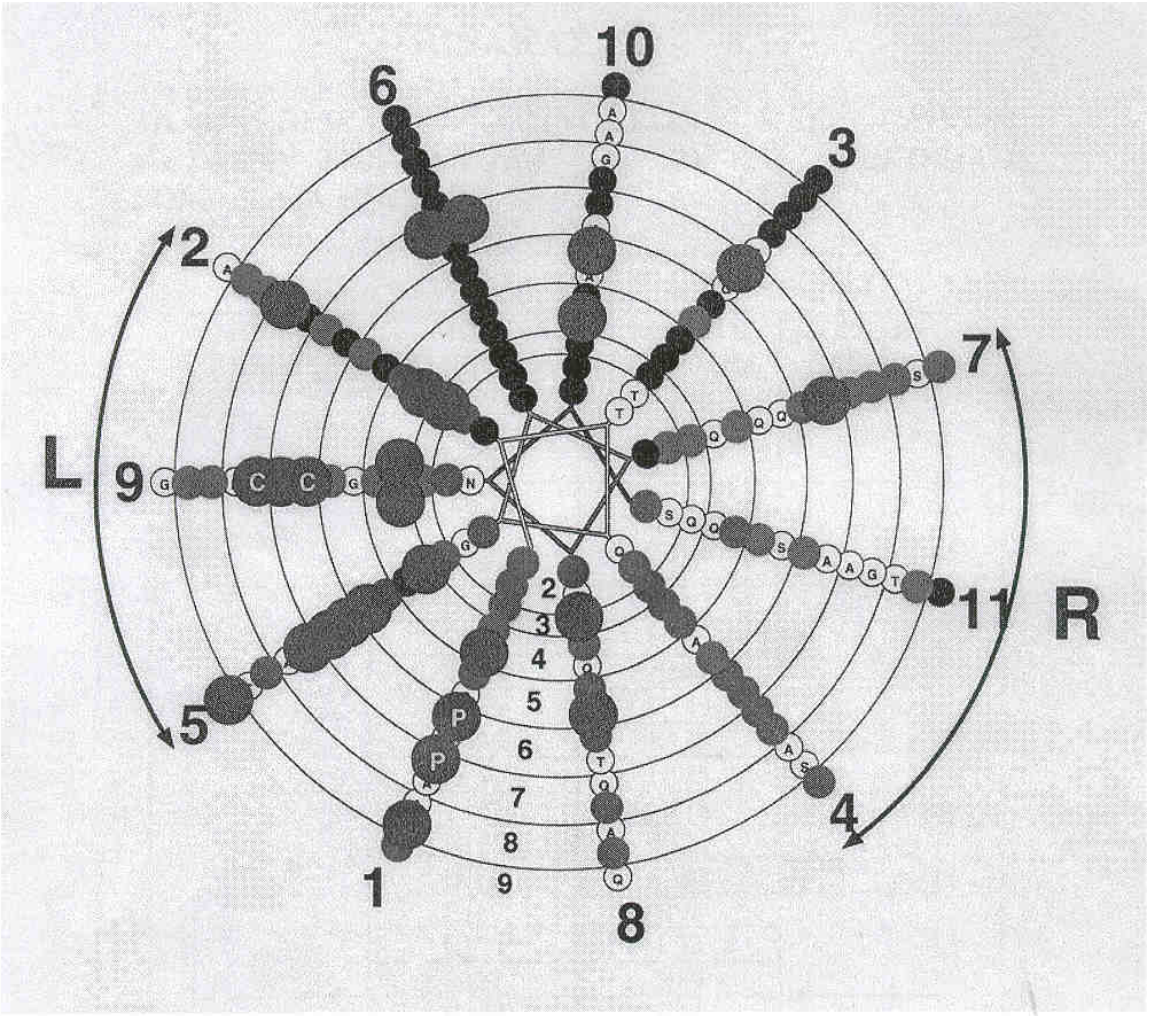
Η παράσταση της αλληλουχίας της αποA-I (αμινοξέα 44-219) σε διάγραμμα ελικοειδούς τροχού (helical wheel analysis), θεωρώντας την ύπαρξη α11/3 έλικας που περιέχει 3.67 αμινοξέα/στροφή, (ή στροφή της έλικας κατά 98.18 μοίρες/αμινοξύ) (Εικόνα 11), αποκάλυψε ότι φορτισμένα αμινοξέα μπορούν να συμμετέχουν σε ιοντικούς δεσμούς μεταξύ των αντιπαράλληλων ελίκων των δύο μορίων στο διμερές της αποA-I. Επίσης η χρήση των μοντέλων έδειξε την ύπαρξη υδρόφοβων επιφανειών οι οποίες μπορούν να ενωθούν με λιπίδια. Με βάση τα παραπάνω οι Segrest et al (80) πρότειναν ότι η αλληλεπίδραση των διμερών της αποA-I ακολουθεί το μοντέλο διπλής ζώνης (double belt model) και μελέτησαν τις συνθήκες της ιδανικής γεωμετρίας του μορίου της αποA-I, οι οποίες μεγιστοποιούν τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις δεσμών άλατος. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν όλες οι πιθανές αλληλεπιδράσεις αμινοξέων μεταξύ των δύο α11/3 ελίκων (ελικοειδών δακτυλιδιών), φέρνοντας τις δύο έλικες σε επαφή και περιστρέφοντας την μια έλικα γύρω από τον άξονα της σε σχέση με την δεύτερη. Με αυτό τον τρόπο καθορίστηκαν αριστερές και δεξιές επιφάνειες επαφής για τις δύο αντιπαράλληλες έλικες του διμερούς ελίκων και βρέθηκαν οι συνδυασμοί (rotomer) με

την πιο ευνοϊκή στοίχιση (alignment) των δεσμών άλατος. Η ευνοϊκότερη στοίχιση των δεσμών άλατος κατά μήκος των δύο αντιπαράλληλων ελίκων του διμερούς της αποA-I έχει την διαμόρφωση αριστερή με αριστερή επιφάνεια (Εικόνα 11) κατά τρόπο που οι αντιπαράλληλες έλικες κάνουν επαφές στις θέσεις 2, 9 και 5 που προκύπτουν από το διάγραμμα του ελικοειδούς τροχού, όπου κάθε αμινοξύ προκαλεί στροφή 98.18 μοιρών στην α11/3 έλικα. Με βάση το μοντέλο αυτό σχηματίζονται οι δεσμοί άλατος μεταξύ των αμινοξέων των δύο αντιπαράλληλων α-ελίκων του διμερούς που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (80).

Τα στοιχεία που υποστηρίζουν το μοντέλο της διπλής ζώνης (80) είναι τα ακόλουθα: 1) Το μοντέλο της διπλής ζώνης είναι σε εξαιρετική συμφωνία με τις γνωστές διαστάσεις και την σύσταση των δισκοειδών σωματιδίων της HDL, 2) Υπάρχει ασύμμετρη κατανομή των φυσικών μεταλλάξεων στην ανθρώπινη αποA-I. Η κατανομή αυτή είναι συμβατή με το μοντέλο ζώνης και όχι με το μοντέλο φράκτη (81), 3) Οι δεσμοί άλατος που προβλέπει το μοντέλο της διπλής ζώνης είναι διατηρημένοι στην ακολουθία της αποA-I σε άλλα θηλαστικά, σε πουλιά και σε ψάρια 4) Ομοδιμερή της αποA-I που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς έχουν απομονωθεί από δύο φυσικές μεταλλάξεις της ανθρώπινης αποA-I (αποA-IParis και αποA-IMilano) (82, 83). Τα δύο διαφορετικά ομοδιμερή φαίνεται απίθανο να συμφωνούν με το μοντέλο φράκτη, αλλά είναι συμβατά με το μοντέλο διπλής ζώνης, σε ελάχιστα τοπικών δεσμών άλατος των διμερών (local salt bridge minima). Τέλος η επικάλυψη των ελίκων στο μοντέλο της διπλής ζώνης συμφωνεί με την πλήρη επιφάνεια των ελίκων που παρατηρείται στην μη επίπεδη κρυσταλλική δομή της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I (70).

Το μοντέλο της διπλής ζώνης (80) έχει ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό που πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν ερμηνεύονται οι συνέπειες σημειακών μεταλλάξεων στην δομή και λειτουργία της αποA-I. Το μοντέλο προτείνει δεσμούς άλατος μεταξύ των αντιπαράλληλων ελίκων των μορίων της αποA-I που σχηματίζουν το διμερές. Ετσι είναι δυνατό μια μετάλλαξη σε μια έλικα, π. χ. την έλικα 6 μπορεί να επηρεάσει συνολικά τους δεσμούς άλατος της μεταλλαγμένης αποA-I στο μοντέλο της διπλής ζώνης. Επίσης μια αλλαγή σε κάποια λειτουργία της αποA-I που παράγεται ως αποτέλεσμα μετάλλαξης στην έλικα 6 δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η έλικα 6 από μόνη της είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη αλλαγή της λειτουργίας. Αντίθετα η μετάλλαξη στην έλικα 6 μπορεί να έχει αλλάξει τη συσχέτιση και τον προσανατολισμό των δακτυλιδιών που αντιπροσωπεύουν τις δύο αντιπαράλληλες έλικες του διμερούς που απαρτίζουν την διπλή ζώνη.

Εικόνα 11: Διάγραμμα ελικοειδούς τροχού των αμφιπαθικών ελίκων 2-9 (αμινοξέων 44-219) της αποΑ-Ι του ανθρώπου. Στο διάγραμμα, το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στο πάνω μέρος και παριστάνονται οι έλικες 2-9 της αποΑ-Ι. Η έλικα έχει 11/3 (3,66667) αμινοξέα ανά στροφή και κάθε αμινοξύ περιστρέφει την έλικα κατά 98,18 μοίρες. Οι αριστερές και οι δεξιές επιφάνειες επαφής παριστάνονται με τόξα L και R αντίστοιχα. Τα υδρόφοβα αμινοξέα παριστάνονται με μαύρους κύκλους, τα βασικά αμινοξέα με μπλε κύκλους, τα όξινα αμινοξέα με κόκκινους κύκλους και οι προλίνες με πράσινους κύκλους. Οι θέσεις των ελίκων 2-9 παριστάνονται με αριθμημένους ομόκεντρους κύκλους.


10
6
3
2
7
L
9
11
R
5
4
1
8

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΕΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-Ι (Α, Β) ΣΕ ΔΙΣΚΟΕΙΔΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ HDL

ΜΟΡΙΟ Α ΕΛΙΚΑ	ΜΟΡΙΟ Α ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΜΟΡΙΟ Β ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΜΟΡΙΟ Β ΕΛΙΚΑ
1	K59	K206	8
2	E70	K195	
	E78	R188	
3	D89	R177	7
	E92	R173	
	K96	E169	
4	D103	H162	6
	D111	H155	
	K118	E147	
5	E125	K140	5
	K133	K133	
	K140	E125	
6	E147	K118	4
	H155	D111	
	H162	D103	
7	E169	K96	3
	R173	E92	
	R177	D89	
8	R188	E78	2
	K195	E70	
	K206	K59	1
10	E235	K239	10
	K239	E235	

Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της έλικας των δύο μορίων

ΙΙ) Δομή της αποA-I σε σφαιρικά σωματίδια HDL

Η μετατροπή των δισκοειδών σωματιδίων της αποA-I σε σφαιρικά σωματίδια περιγράφεται πιο αναλυτικά στην βιογένεση της HDL. Τα σφαιρικά σωματίδια της HDL είναι αρκετά ετερογενή στην σύσταση τους σε απολιποπρωτεΐνη και λιπίδια, καθώς και στην πυκνότητα και το μέγεθος του σωματιδίου. Ταξινομούνται σε διάφορους υποπληθυσμούς, με βάση την πυκνότητα και το μέγεθος (84), όπως καθορίζονται από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και την σύσταση σε απολιποπρωτεΐνες, όπως καθορίζεται από χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας (8, 85).

Τα σωματίδια της σφαιρικής HDL περιέχουν 2 ή 4 μόρια της πρωτεΐνης αποA-I και η δομή των σωματιδίων αυτών μπορεί να ακολουθεί το μοντέλο διπλής ζώνης που προτάθηκε για τα δισκοειδή σωματίδια HDL. Όπως αναφέρθηκε η δομή της αποA-I, με βάση την κρυσταλλογραφία, είναι μη επίπεδη και πιθανώς αντιπροσωπεύει ιδανική α-έλικα, που περιέχει 3.6 αμινοξέα ανά στροφή. Τέτοια είναι πιθανώς η δομή της A-I στην σφαιρική HDL. Ενδέχεται η μετατροπή της δισκοειδούς σε σφαιρική HDL, που καταλύεται από το ένζυμο LCAT (4, 19, 25, 86), να εμπεριέχει την μετατροπή της δομής α11/3 έλικας (74) σε μια ιδανική δομή α-έλικας σε όλα ή τμήματα της καρβοξυτελικής περιοχής της αποA-I. Οι Borhani et al (70) προτείνουν ότι η σύνδεση της αποA-I σε σφαιρικά σωματίδια HDL, που περιέχουν 2 ή 4 μόρια αποA-I, μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό δισκοειδών ή ελλειπτικών ή σφαιρικών σωματιδίων.

ΣΤ) Λειτουργίες της αποΑ-Ι

1) Σύνδεση με λιπίδια και λιποπρωτεΐνες

Ι) Περιοχές της αποΑ-Ι που συμμετέχουν στην σύνδεση με φωσφολιπίδια και με την HDL

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, η αποΑ-Ι σε υδατικό διάλυμα, απουσία λιπιδίων, αποτελεί πρωτεΐνη με χαλαρή διπλωμένη στερεοδιαμόρφωση (conformation) και χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλή ελεύθερη ενέργεια σταθεροποίησης (68). Η σύνδεση της αποΑ-Ι με λιπίδια αυξάνει το ποσοστό α-έλικας της αποΑ-Ι από 10 σε 30%, ανάλογα με το ποσό και την σύσταση των λιπιδίων (87, 88, 89, 90). Η σύνδεση με λιπίδια σταθεροποιεί σημαντικά την δομή της πρωτεΐνης.

Η ανάλυση της συγγένειας της σύνδεσης διαφόρων αμφιπαθικών ελίκων της αποΑ-Ι με λιπίδια έδειξε ότι πεπτίδια που αντιστοιχούν στις έλικες 1, 2 και 9, 10 έχουν την μεγαλύτερη συγγένεια με λιπίδια από τις άλλες ελικοειδείς περιοχές της αποΑ-Ι (91, 92). Επιπλέον δεν υπάρχει συνεργατικότητα μεταξύ των διπλανών αμφιπαθικών ελίκων της αποΑ-Ι κατά την σύνδεση με τα λιπίδια (91, 92). Μελέτες μεταλλαγμένων μορφών της αποΑ-Ι, από τους Rogers et al (93) έδειξαν επίσης ότι η η έλικα 1 και η έλικα 10 είναι απαραίτητες για την σύνδεση της αποΑ-Ι με φωσφολιπίδια (POPC και DMPC), ενώ η παρουσία της έλικας 3 (88-98) είναι σημαντική για την σωστή στερεοδιαμόρφωση της αποΑ-Ι τόσο σε υδατικό διάλυμα, όσο και στην κατάσταση όπου η πρωτεΐνη είναι συνδεδεμένη με λιπίδια. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η αρχική ταχύτητα σύνδεσης της αποΑ-Ι με πολυμεμβρανικά λιποσώματα (multilamellar vesicles) του φωσφολιπιδίου DMPC μειώνεται όταν απαλοιφούν οι κεντρικές έλικες 5-7, οι οποίες φαίνεται ότι συνεισφέρουν στην σταθεροποίηση της πρωτεΐνης αποΑ-Ι, όταν είναι συνδεδεμένη με λιπίδια (94). Τέλος μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι στις οποίες έχουν απαλοιφεί καρβοξυτελικές έλικες (95) έδειξαν μειωμένη σύνδεση με φωσφολιπίδια και ελαττωματική σύνδεση της αποΑ-Ι με την HDL.

Οι απαλοιφές ολοκλήρων τμημάτων της αποΑ-Ι δίνουν σημαντικές πληροφορίες αλλά οι αλλαγές της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα μπορεί να επηρεάζουν δραστικά την αναδίπλωση της (folding) στο χώρο. Για να παρακαμθεί αυτό το πρόβλημα έγιναν σημειακές μεταλλάξεις σε διαφορετικές περιοχές στο γονίδιο της αποΑ-Ι (95) και μελετήθηκε η ικανότητα των διαφόρων μορφών να συνδεθούν με φωσφολιπίδια και λιποπρωτεΐνες. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αντικατάσταση μιας σειράς φορτισμένων αμινοξέων από ουδέτερα αμινοξέα μεταξύ των υπολλειμάτων 110 και 239 δεν επηρεάζει

σημαντικά την ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών να συνδέονται στην HDL, φανερώνοντας ότι οι ιονικές αλληλεπιδράσεις μέσα σε μια έλικα ή μεταξύ των ελίκων δεν επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα της αποA-I να συνδεθεί με την HDL και με φωσφολιπίδια. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με την παρουσία, στον γενικό πληθυσμό, αρκετών αντικαταστάσεων φορτισμένων από ουδέτερα αμινοξέα οι οποίες δεν επηρεάζουν τα επίπεδα της HDL στους φορείς των εν λόγω μεταλλάξεων (2, 81).

Αντίθετα, η αντικατάσταση των υδρόφοβων αμινοξέων Leu^{222}, Phe^{225}, Phe^{229} από λυσίνη όπως και η αντικατάσταση του αμινοξέος λευκίνη στις θέσεις 211, 214, 218 και 219 της έλικας 9 από βαλίνη, επηρεάζουν δραματικά την ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών να συνδεθούν με την HDL και την ικανότητα και ταχύτητα σύνδεσης με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC (95). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις και από μελέτες με συνθετικά πεπτίδια (91, 92) έχει προταθεί ότι αυτή η αρκετά υδρόφοβη περιοχή (καρβοξυτελική) της αποA-I έχει την ικανότητα να εισχωρεί στις στοιβάδες φωσφολιπιδίων της HDL και με αυτό τον τρόπο να δεσμεύει την πρωτεΐνη πάνω στην επιφάνεια της λιποπρωτεΐνης (69, 169). Μετά την αρχική σύνδεση το υπόλοιπο μόριο της αποA-I μπορεί να τυλιχθεί γύρω από το σωματίδιο της HDL κατά τρόπο που οι μη πολικές επιφάνειες των α-ελίκων να προσανατολισθούν στο εσωτερικό προς την πλευρά των υδρόφοβων αλυσίδων των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης ενώ οι πολικές φάσεις να προσανατολισθούν προς το εξωτερικό υδατικό περιβάλλον.

ΙΙ) Ταξινόμηση της HDL του πλάσματος

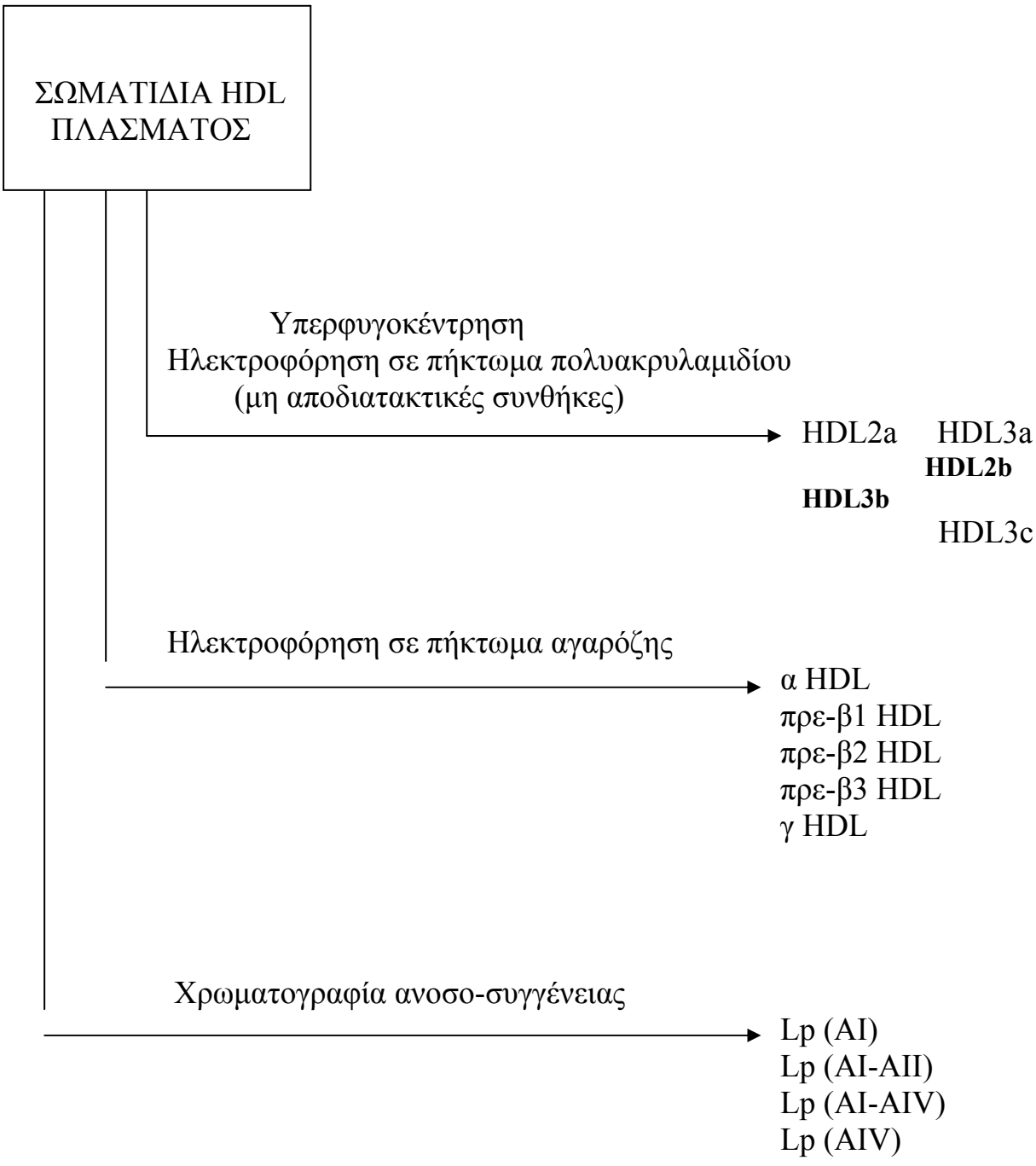
Η ταξινόμηση των σωματιδίων της HDL του πλάσματος γίνεται με τρεις τρόπους και φαίνεται στην εικόνα 12.

α) Ταξινόμηση με βάση την πυκνότητα ή το μέγεθος

Λόγω της ύπαρξης διαφορών στην σχετική σύσταση των εστέρων χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών, οι λιποπρωτεΐνες HDL διαχωρίζονται με υπερφυγοκέντρηση σε δύο πληθυσμούς διαφορετικής πυκνότητας, HDL_2 (1.063-1.125 g/ml) και HDL_3 (1.125-1.21 g/ml) (84). Οι HDL_2 και HDL_3 δεν αποτελούν δομικά και λειτουργικά ξεχωριστές οντότητες, αλλά περιέχουν διαφορετικού μεγέθους σωματίδια. Επίσης, τα σωματίδια HDL διαχωρίζονται, με βάση το μέγεθος τους, με ηλεκτροφόρηση διαβάθμισης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, υπό μη αποταδιακτικές συνθήκες. Η HDL_2 υποδιαιρείται σε δύο υποπληθησμούς: HDL_{2a} (διάμετρος Stoke 88-97 Å), και HDL_{2b} (διάμετρος Stoke 97-120 Å). Με παρόμοιο τρόπο η HDL_3 υποδιαιρείται σε τρεις

Εικόνα 12: Υποπληθυσμοί της HDL, με βάση τις τεχνικές διαχωρισμού τους.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ



υποπληθησμούς, HDL_{3a} (διάμετρος Stoke 72-78 Å), HDL_{3b} (διάμετρος Stoke 78-82 Å) και HDL_{3c} (διάμετρος Stoke 82-88 Å).

β) Ταξινόμηση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης εντόπισε ένα μικρό ποσό της HDL, που χαρακτηρίζεται από πρε-β ηλεκτροφορητική κινητικότητα, εν σχέσει με την πλειονότητα της HDL που έχει α-ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων αυτών προκαλείται είτε λόγω διαφορών στην περιεκτικότητα σε φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, είτε άμεσα λόγω αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης (conformation) των απολιποπρωτεϊνών που υπάρχουν στο σωματίδιο, εξαιτίας της παρουσίας του πυρήνα που περιέχει ουδέτερα λιπίδια (96). Η ηλεκτροφόρηση διαβάθμισης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, υπό μη αποταδιακτικές συνθήκες, διαχωρίζει τις πρε-β HDL και α HDL, με βάση το μέγεθος τους. Η πρε-β-1 HDL αποτελεί το 2-5% της HDL του πλάσματος, και συνήθως αποτελείται από μικρά σωματίδια, με μοριακή μάζα 60-70 kDa, και υπολογιζόμενη διάμετρο 50-60 Å (97). Η αποA-I αποτελεί την μοναδική πρωτεΐνη των σωματιδίων αυτών, και η επί τοις % σύσταση τους σε λιπίδια ποικίλλει από 10-40% (98). Η διαμόρφωση της αποA-I στην πρε-β-1 HDL είναι διαφορετική από αυτήν των άλλων σωματιδίων της HDL και συγκεκριμένα το ποσοστό α-έλικας είναι πολύ χαμηλότερο. Στην πρε-β-1 HDL τα λιπίδια λεκιθίνη και σφιγγομυελίνη απαντώνται σε σχεδόν σε ίσες μοριακές συγκεντρώσεις.

Η πρε-β-2 HDL αποτελεί το 2-3% της ολικής μάζας της HDL του πλάσματος και όπως και η πρε-β-1 HDL περιέχει μόνο αποA-I, ως πρωτεϊνικό συστατικό (98). Τα σωματίδια αυτά είναι πλούσια σε λεκιθίνη, αλλά περιέχουν μόνο μικρό ποσό σφιγγομυελίνης και χοληστερόλης, και σχεδόν καθόλου ουδέτερους εστέρες λιπιδίων. Οι διαφορές μεταξύ της πρε-β-1 HDL και της πρε-β-2 HDL αφορούν κυρίως το ποσοστό της λεκιθίνης, και την δομή της αποA-I.

Τέλος έχει ταυτοποιηθεί και μια μορφή πρε-β-3 HDL, η οποία είναι πιθανό να αποτελεί σύμπλοκο μεταξύ της πρε-β-2 HDL και του ενζύμου LCAT, καθώς επίσης και ένα σωματίδιο που περιέχει CETP και αποD (99).

Η πλειονότητα της HDL στο πλάσμα συνίσταται από σφαιρικά σωματίδια, διαμέτρου 90-120 Å, που έχουν α-ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης. Μελέτες in vitro (100, 101), καθώς και μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια (102) έδειξαν ότι η μετατροπή της πρε-β HDL σε α HDL γίνεται με τη δράση του ενζύμου LCAT.

Επίσης έχει ταυτοποιηθεί και ένας υποπληθυσμός HDL, που χαρακτηρίζεται από γ-ηλεκτροφορητική κινητικότητα (103). Η γ HDL περιέχει μόνο αποE και είναι πλούσια

σε σφιγγομυελίνη. Η γ HDL έχει βρεθεί στο πλάσμα των ποντικών που δεν έχουν αποA-I. Τα σωματίδια της γ HDL αποτελούν πολύ αποτελεσματικούς δέκτες της κυτταρικής χοληστερόλης.

γ) Ταξινόμηση με χρήση χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας

Η χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας διαχωρίζει την HDL του πλάσματος και τις λιποπρωτεΐνες που εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων σε υποπληθυσμούς με διαφορετική σύσταση σε απολιποπρωτεΐνες (8, 85). Τα σωματίδια που απομονώνονται πιο συχνά είναι τα Lp(AI), τα οποία περιέχουν μόνο αποA-I (11-45 % της ολικής HDL), και τα Lp(AI-AII), τα οποία περιέχουν αποA-I και αποA-II. Στο πλάσμα φυσιολογικών ατόμων, τα σωματίδια Lp(AI) και Lp(AI-AII) περιέχουν περίπου το 25% και 65% της ολικής αποA-I του πλάσματος αντίστοιχα. Αυτά τα σωματίδια δεν διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό όσον αφορά την σύσταση σε λιπίδια, την σύσταση σε αποA-IV, αποC, αποD και αποE. Τα σωματίδια Lp(AI) περιέχουν πολύ περισσότερο ένζυμο LCAT, αποJ και CETP, συγκριτικά με τα σωματίδια Lp(AI-AII) (85). Επίσης έχει δειχθεί ότι η δευτεροταγής δομή της αποA-I στα σφαιρικά σωματίδια Lp(AI) και Lp(AI-AII) είναι εξαιρετικά παρόμοια. Η πλειονότητα των σωματιδίων Lp(AI) έχει την ίδια πυκνότητα με HDL_2, ενώ η πλειονότητα των σωματιδίων Lp(AI-AII) επιπλέει στην πυκνότητα της HDL_3.

Η χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας εμφανίζει και υποπληθυσμούς HDL που περιέχουν αποA-IV, σε σωματίδια Lp(AIV) και Lp(AI-AIV). Τα σωματίδια αυτά περιέχουν περισσότερα τριγλυκερίδια, λιγότερα φωσφολιπίδια, και έχουν παρόμοια ικανότητα με τα σωματίδια Lp(AI) και Lp(AI-AII) να προάγουν την έξοδο της χοληστερόλης από λιποκύτταρα, και επίσης ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες LCAT και CETP στον ίδιο βαθμό όπως τα σωματίδια Lp(AI) και Lp(AI-AII) (104).

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το μέγεθος της HDL κατά την διάρκεια παραμονής στο πλάσμα μπορεί να μεταβάλλεται, χωρίς αλλαγή στην δευτεροταγή δομή της αποA-I των μεγάλων και μικρών σφαιρικών σωματιδίων HDL (98).

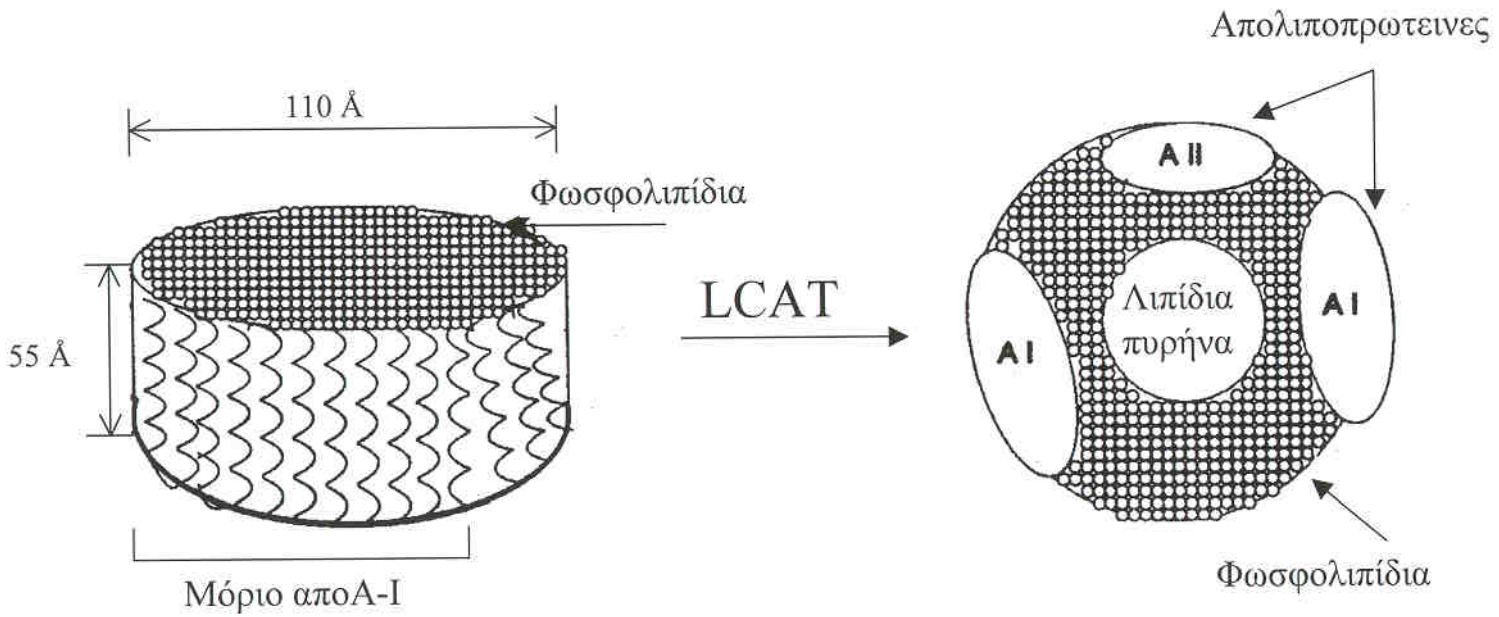
III) Βιογένεση και καταβολισμός της HDL

Η αποA-I συντίθεται από το έντερο, εκκρίνεται με τα χυλομικρά (4) και μεταφέρεται στην HDL όταν τα χυλομικρά εισέλθουν στην συστεμική κυκλοφορία. Η αποA-I που συντίθεται από το ήπαρ εκκρίνεται κυρίως ελεύθερη λιπιδίων (2, 28). Η δέσμευση μικρής ποσότητας φωσφολιπιδίου που προέρχεται από τις κυτταρικές μεμβράνες οδηγεί στον σχηματισμό της νεοσυντεθείσας μορφής HDL, που έχει πρε-β ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Τα σωματίδια της πρε-β HDL (πρε-β-1, πρε-β-2 και πρε-

β-3) έχουν διαφορετική σύσταση λιπιδίων και χαρακτηρίζονται από διαφορετική στερεοδιαμόρφωση της αποA-I και πιθανώς διαφορετικές βιολογικές δράσεις (98). Η πρε-β-1 HDL περιέχει μόνο 2 μόρια πρωτεΐνης αποA-I και λίγα μόρια λιπιδίων. Η αποA-I στην πρε-β-1 HDL έχει πολύ μικρότερο ποσό α-έλικας, και έχει προταθεί ότι η μοναδική αυτή στερεοδιαμόρφωση της αποA-I μπορεί να περιέχει μια θέση δέσμευσης στερόλης (98). Η πρε-β HDL φαίνεται ότι αποτελεί την πιο αποτελεσματική μορφή της HDL για την επαγωγή της εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα (105). Έχει προταθεί ότι η απόσπαση της χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη γίνεται με μικροδιαλυτοποίηση και υδατική διάχυση με τρόπο που εξαρτάται από το ποσοστό των λιπιδίων που είναι συνδεδεμένα με την αποA-I (106). Τα σωματίδια της πρε-β HDL στο πλάσμα μεγαλώνουν με την μεταφορά χοληστερόλης και λεκιθίνης, που προέρχονται είτε από τις κυτταρικές μεμβράνες, είτε από άλλες λιποπρωτεΐνες, με την δράση ενζύμων του πλάσματος (π. χ. μεταφορά φωσφολιπιδίων από τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών πλουσίων σε τριγλυκερίδια με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL) και της πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP) (13). Έτσι σχηματίζονται δισκοειδή σωματίδια HDL (πρε-β-2 HDL) που περιέχουν μόνο πολικά λιπίδια (λεκιθίνη, σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη), και δεν περιέχουν εστέρες χοληστερόλης. Τα σωματίδια αυτά μπορεί να περιέχουν 3 ή 4 μόρια αποA-I (98). Στο πλάσμα, τα δισκοειδή αυτά σωματίδια αποτελούν το πιο αποτελεσματικό υπόστρωμα για το ένζυμο LCAT. Η επακόλουθη εστεροποίηση της χοληστερόλης από το ένζυμο LCAT δημιουργεί ένα πυρήνα εστέρων χοληστερόλης και τα δισκοειδή σωματίδια μετατρέπονται σε σφαιρικά σωματίδια που περιέχουν πολικά και μη πολικά λιπίδια, που χαρακτηρίζονται από α-ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης (μορφές HDL_2 και HDL_3) (100, 102, 107) (Εικόνα 13).

Οι μορφές HDL_2 και HDL_3 περιέχουν ποικίλα σωματίδια, που μετατρέπονται το ένα στο άλλο μέσω δράσης των ενζύμων του πλάσματος. Έτσι, η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων της HDL_2 από την ηπατική λιπάση σχηματίζει την HDL_3 (108). Πρόσφατα δείχθηκε ότι η ενζυματική δράση της ηπατικής λιπάσης στους ανθρώπους μπορεί να επηρεάσει την κατανομή των υποπληθυσμών της HDL (109). Επίσης πρόσφατα έχει παρατηρηθεί ότι η υδρόλυση της HDL_2 από την ηπατική λιπάση οδηγεί στον σχηματισμό πρε-β-1 HDL και ενός σωματιδίου HDL_2, που έχει διαφορετική στερεοδιαμόρφωση της αποA-I (110). Επίσης πρόσφατα βρέθηκε μια καινούρια λιπάση, η οποία εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και έχει ενζυματική δράση φωσφολιπάσης. Η υπερέκφραση της ενδοθηλιακής λιπάσης σε ποντίκια ελλατώνει

Εικόνα 13: Σχηματική παρουσίαση μετατροπής ενός δισκοειδούς σωματιδίου HDL σε σφαιρικό σωματίδιο HDL. Η εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης από το ένζυμο LCAT παρέχει στο δισκοειδές σωματίδιο HDL ένα πυρήνα μη πολικών εστέρων χοληστερόλης.


110 Å
Φωσφολιπίδια
55 Å
Μόριο αποA-I
LCAT
Απολιποπρωτεινες
AII
AI
AI
Λιπίδια
πυρήνα
Φωσφολιπίδια

τα επίπεδα της HDL στο πλάσμα (111). Η δράση της πρωτεΐνης μεταφοράς των φωσφολιπιδίων (PLTP) προάγει την μεταφορά φωσφολιπιδίων από λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε τριγλυκερίδια (όπως VLDL) στην HDL_3 και αυτό οδηγεί στην μετατροπή της HDL_3 σε HDL_2 (112, 113). Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια, όπου έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο της PLTP έδειξαν ότι η PLTP αποτελεί βασικό παράγοντα μεταφοράς των φωσφολιπιδίων της VLDL στην HDL, και ότι η μεταφορά αυτή είναι απαραίτητη για την διατήρηση των επιπέδων της HDL (114).

Εκτός από την δράση των ενζύμων του πλάσματος, ο μετασχηματισμός των σωματιδίων της HDL μπορεί να γίνει με την αντικατάσταση της αποA-I από έλικες της αποA-II. Η αποA-II αποτελεί το δεύτερο κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL και πιστεύεται ότι περιέχει 3 αμφιπαθικές α-έλικες. Η αποA-I της HDL μπορεί να αντικατασταθεί από την αποA-II, όταν σωματίδια HDL επωαστούν με αποA-II σε 37^{o} C (115). Η αντικατάσταση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας της HDL που είναι εμπλουτισμένη με αποA-II να ενεργοποιήσει το ένζυμο LCAT. Επίσης η αντικατάσταση της αποA-I από την αποA-II σε σωματίδια HDL του πλάσματος μπορεί να δημιουργήσει πρε-β-1 σωματίδια, τα οποία περιέχουν μόνο αποA-I και φωσφολιπίδια (116).

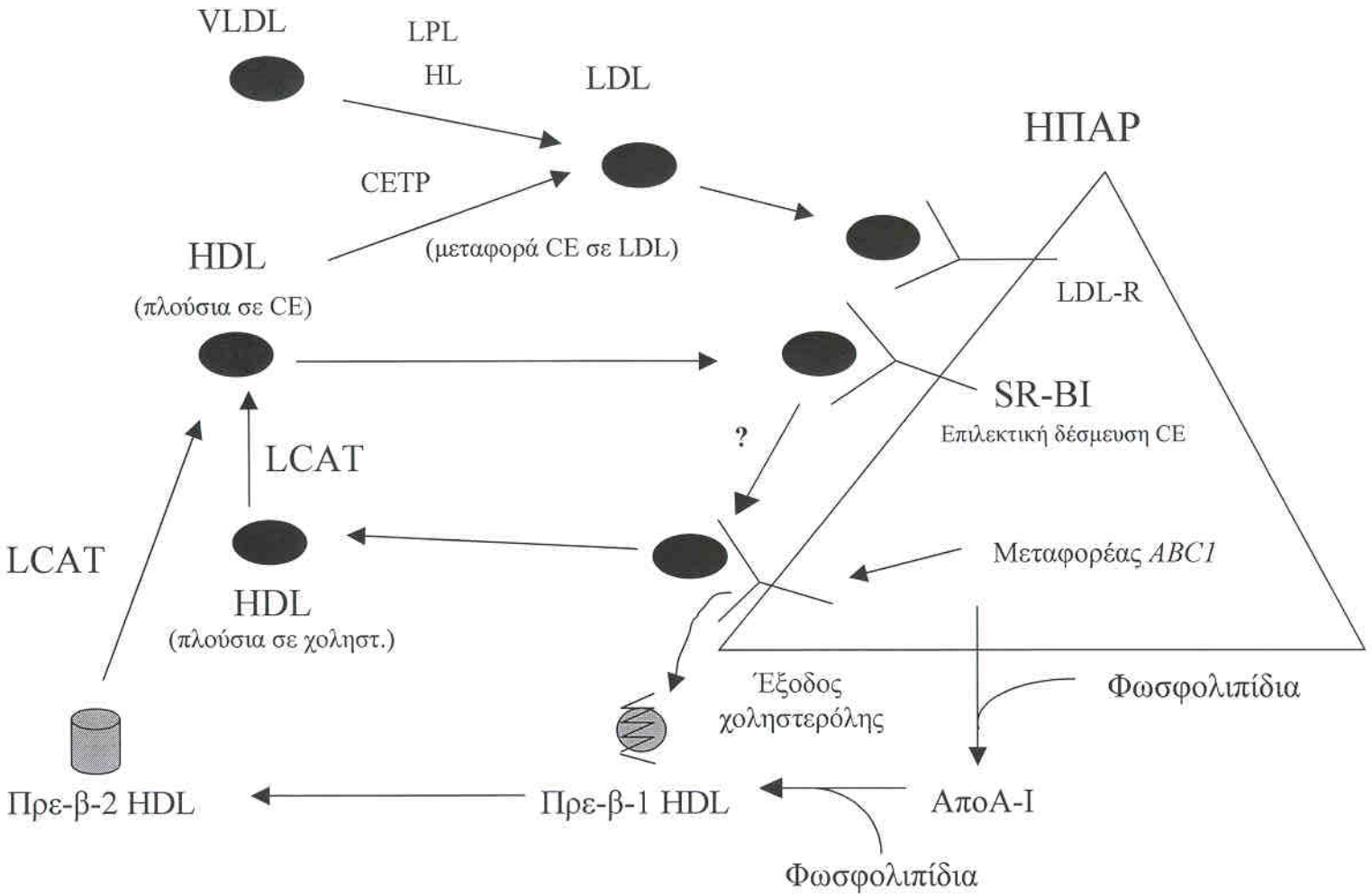
Οι εστέρες χοληστερόλης του σωματιδίου της HDL μπορούν να μεταφερθούν στο ήπαρ με τουλάχιστον τρεις μηχανισμούς: 1) οι εστέρες της χοληστερόλης μεταφέρονται από την HDL στην LDL, IDL και VLDL, με τη δράση της πρωτεΐνης μεταφοράς των εστέρων χοληστερόλης (CETP). Στη συνέχεια οι λιποπρωτεΐνες χαμηλότερης πυκνότητας αναγνωρίζονται και δεσμεύονται στο ήπαρ ή σε περιφερικούς ιστούς μέσω του υποδοχέα της LDL και άλλων υποδοχέων της αποE (117), 2) ένας υποπληθυσμός της HDL προσλαμβάνει αποE και αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα της LDL και άλλους υποδοχείς των ηπατοκυττάρων που μπορούν να συνδέσουν την αποE, και 3) Η HDL αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα SR-BI (118, 119, 120, 121) που υπάρχει σε ηπατοκύτταρα και προάγει την επιλεκτική μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης, και για τον οποίο θα μιλήσουμε αναλυτικά αργότερα. Ο υποδοχέας SR-BI επίσης προάγει την επιλεκτική μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης της HDL και σε στεροειδογενείς ιστούς (επινεφρίδια, ωοθήκες), με σκοπό τη χρησιμοποίησή της για την σύνθεση των στεροειδών ορμονών (118, 122).

Η επιλεκτική μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης της HDL μέσω του υποδοχέα SR-BI, μπορεί να γίνεται με πολύπλοκο μηχανισμό και συντονισμένη δράση διαφόρων πρωτεϊνών όπως οι λιπάσες και οι πρωτεΐνες-μεταφοράς των λιπιδίων CETP,

PLTP και LCAT. Η ηπατική λιπάση αποτελεί ένα βασικό ένζυμο του μεταβολισμού της HDL και δρά με δύο τρόπους: Ως ένζυμο προκαλεί την λιπόλυση των σωματιδίων της HDL και προάγει την μεταφορά λιπιδίων μεταξύ των διαφόρων υποπληθυσμών της HDL. Παράλληλα η ηπατική λιπάση συμβάλλει στη πρόσληψη της HDL όταν είναι προσδεδεμένη με πρωτεογλυκάνες στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Διάφορες μελέτες συνηγορούν με την υπόθεση ότι η ηπατική λιπάση και ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να δρουν σε συνδυασμό κατά την επιλεκτική είσοδο των εστέρων της χοληστερόλης της HDL στα κύτταρα. Τα πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση είναι τα ακόλουθα: α) Η ενζυματική δράση της ηπατικής λιπάσης μπορεί να διευκολύνει την επιλεκτική είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL μέσω του υποδοχέα SR-BI (123, 124), β) Ο υποδοχέας SR-BI και η ηπατική λιπάση εκφράζονται σε αφθονία σε ιστούς όπου παρατηρούνται τα υψηλότερα ποσοστά μεταφοράς χοληστερόλης της HDL, μέσω επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων (120, 121) και 3) η έκφραση του υποδοχέα SR-BI στα επινεφρίδια αυξάνεται σε ποντίκια που δεν εκφράζουν ηπατική λιπάση (125) και σε αρουραίους που έχουν ενεθεί με αντισώματα ενάντια στην ηπατική λιπάση (126). Ο μηχανισμός με τον οποίο η ηπατική λιπάση ενισχύει την επιλεκτική μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τον υποδοχέα SR-BI βρίσκεται υπό μελέτη. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η συνδυασμένη δράση της CETP και της ηπατικής λιπάσης στον μετασχηματισμό των σωματιδίων της HDL, προάγει την επιλεκτική πρόσληψη της χοληστερόλης της HDL από το ήπαρ, μέσω του υποδοχέα SR-BI (124, 127).

Στην εικόνα 14 παριστάνεται διαγραμματικά η βιοσύνθεση της HDL, ο σχηματισμός των διαφόρων υποπληθυσμών της HDL καθώς και ο καταβολισμός τους από το ήπαρ.

Εικόνα 14: Μονοπάτι της βιογένεσης και του καταβολισμού της HDL από το ήπαρ.


VLDL
LPL
HL
LDL
ΗΠΑΡ
CETP
(μεταφορά CE σε LDL)
HDL
(πλούσια σε CE)
LDL-R
SR-BI
Επιλεκτική δέσμευση CE
?
LCAT
LCAT
Μεταφορέας ABC1
HDL
(πλούσια σε χοληστ.)
Έξοδος
χοληστερόλης
Φωσφολιπίδια
Πρε-β-2 HDL
Πρε-β-1 HDL
ΑποΑ-Ι
Φωσφολιπίδια

Ο υποδοχέας της κουβιλίνης (cubilin)

Τον τελευταίο χρόνο δύο διαφορετικές ομάδες ταυτοποίησαν ανεξάρτητα ένα καινούριο υποδοχέα της HDL και της αποA-I (128, 129), που ονομάστηκε κουβιλίνη (cubilin). Η κουβιλίνη αποτελεί τον υποδοχέα για το σύμπλοκο ενδογενούς παράγοντα-βιταμίνης B12 (130). Είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη (460 kDα) που εκφράζεται σε απορροφητικά επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού, του εντέρου, του εμβρυϊκού σάκου και του πλακούντα (131). Η σύνδεση της HDL και της αποA-I με την κουβιλίνη οδηγεί στην ενδοκύττωσή τους, η οποία περιλαμβάνει την μεταφορά τους στα λυσοσώματα, με τρόπο αντίστοιχο με το κλασσικό μονοπάτι ενδοκύττωσης της LDL (128, 129). Η δέσμευση των σωματιδίων της HDL από την κουβιλίνη μπορεί να υπηρετεί διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες στα επιθήλια διαφορετικών οργάνων. Τα υπάρχοντα δεδομένα φανερώνουν ότι στο νεφρό η κουβιλίνη πιθανώς να δρα ως υποδοχέας για την τελική απομάκρυνση της αποA-I. Στον εμβρυϊκό σάκο η κουβιλίνη μπορεί να παίζει ειδικό και σημαντικό ρόλο στην μεταφορά της χοληστερόλης της HDL από την μητέρα στο έμβρυο (132).

IV) Σύνδεση της αποA-I με λιπίδια σε δοκιμαστικό σωλήνα-σχηματισμός σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL)

Η αλληλεπίδραση της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων οδηγεί στην παραγωγή δισκοειδών σωματιδίων που μοιάζουν με τις φυσιολογικές μορφές της νεοσυντεθείσας HDL, και έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (78, 133, 134, 135). Η φύση και το μέγεθος των σωματιδίων rHDL που περιέχουν αποA-I (rHDL{αποA-I}) εξαρτάται από την αναλογία του φωσφολιπιδίου προς την απολιποπρωτεΐνη στο μείγμα της αντίδρασης και το είδος του φωσφολιπιδίου.

Η ανάμειξη της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC, που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία με υπερήχους (multilamellar vesicles), ή με μικρές λιπιδικές μονοστοιβάδες (small unilamellar vesicles), μετά από επεξεργασία με υπερήχους, σε 24^{o} C ή 37^{o} C, προκαλεί την διαύγεια του λιποσωμικού αιωρήματος. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται επώαση της αποA-I περίπου 6-12 ωρών με τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου και μιας ώρας με τις μικρές λιπιδικές μονοστοιβάδες. Ο διαχωρισμός των σωματιδίων rHDL (πρωτεολιποσωμάτων) με χρωματογραφία στήλης και ηλεκτρονική μικροσκοπία, φανερώνει τον σχηματισμό δισκοειδών σωματιδίων. Η διάμετρος των σωματιδίων αυτών αυξάνει όσο αυξάνεται η αναλογία του λιπιδίου προς την αποA-I. Η ελεύθερη ενέργεια σταθεροποίησης της αποA-I επίσης αυξάνει όσο αυξάνει η διάμετρος του δισκοειδούς σωματιδίου (136). Η ταχύτητα

της αντίδρασης είναι πιο μικρή, όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε διάλυμα ως ολιγομερές, έναντι της μονομερούς μορφής, και η αντίδραση είναι ταχύτερη στην μεταβατική θερμοκρασία του λιπιδίου, π. χ. όταν συνυπάρχουν οι φάσεις του πηκτώματος και η υγρή-κρυσταλλική φάση. Στην κατάσταση αυτή οι ατέλειες στο λιπιδικό πλέγμα επιτρέπουν την εισχώρηση της αποA-I στην λιπιδική διπλοστοιβάδα (136).

Δισκοειδή 'μυκήλια' (micellar vesicles) που περιέχουν αποA-I και φωσφολιπιδία μπορούν να σχηματιστούν και με μικρότερης αλυσίδας, κορεσμένα φωσφολιπίδια (DPPC και σφιγγομυελίνη) (137, 138). Το φωσφολιπίδιο POPC δεν μπορεί να αντιδράσει αυθόρμητα με την αποA-I για τον σχηματισμό 'μυκηλίων' (micelles), ακόμη και αν η επώαση γίνει σε θερμοκρασίες που βρίσκονται κοντά στην θερμοκρασία της μεταβατικής κατάστασής του (138). Η ενσωμάτωση της χοληστερόλης, σε μικρά ποσά (μέχρι 12% σε μοριακή αναλογία) στα σωματίδια αποA-I-φωσφολιπιδίων αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χοληστερόλης, (20-30% σε μοριακή αναλογία), ελαττώνεται σε μεγάλο βαθμό η ταχύτητα της αντίδρασης (138).

Η μέθοδος της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου αναπτύχθηκε από την Jonas et al (139), και διευκολύνει την αλληλεπίδραση της αποA-I με φωσφολιπίδια τα οποία βρίσκονται στην υγρή-κρυσταλλική φάση, ή που έχουν εξαιρετικά μεγάλες αλυσίδες, ή μεγάλη περιεκτικότητα σε χοληστερόλη. Όταν χολικά άλατα και φωσφολιπίδια αναμειχθούν σε αναλογίες που δεν ξεπερνούν το 2 προς 1, τα χολικά άλατα διαλύουν τα φωσφολιπίδια σε μικρά 'μυκήλια' (micelles). Το μέγεθος των μυκηλίων είναι αντιστρόφως ανάλογο της αναλογίας του χολικού άλατος προς το φωσφολιπίδιο. Η πλειονότητα των χολικών αλάτων σχηματίζει ένα δακτύλιο γύρω από το εξωτερικό μέρος της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, ενώ ένα μικρό ποσοστό εισχωρεί μέσα στην διπλοστοιβάδα. Είναι πιθανό ότι η αποA-I και τα χολικά άλατα ανταγωνίζονται για την υδροφοβική επιφάνεια της λεκιθίνης σε μεικτά μυκήλια (mixed micelles). Η απομάκρυνση του χολικού άλατος επιτυγχάνεται με διαπίδυση, και με αυτό τον τρόπο παραμένουν τα δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν αποA-I και φωσφολιπίδια (138).

Οι Jonas et al (140) έδειξαν ότι με την χρήση της μεθόδου διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου μπορούν να παρασκευασθούν ομοιογενή δισκοειδή σωματίδια αποA-I και POPC. Η ανάλυση των σωματιδίων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης πολυακρυλαμιδίου, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, καθώς και η ανάλυση τους με κυκλικό διχροϊσμό και με πειράματα διασύνδεσης της αποA-I (cross-linking) έδειξε ότι περιέχουν 2 ή 3 μόρια αποA-I ανά δισκοειδές σωματίδιο. Η κατηγορία των rHDL με 3 μόρια αποA-I έχει διάμετρο είτε 109 είτε 120 Å. Η κατηγορία των rHDL με 2 μόρια

αποA-I περιλαμβάνει σωματίδια με διαμέτρους 77, 86 και 96 Å. Η στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης είναι διαφορετική στα σωματίδια με διαφορετικό μέγεθος. Οι Jonas et al (140) πρότειναν ότι υπάρχουν 6, 7 και 8 τμήματα α-έλικας της αποA-I που έρχονται σε επαφή με τα λιπίδια στα σωματίδια με διαμέτρους 77, 86 και 96 Å αντίστοιχα.

Τα δισκοειδή σωματίδια rHDL μπορούν να παρασκευαστούν και με άλλες απολιποπρωτεΐνες, όπως αποA-I, αποA-II, αποE και αποC. Επίσης μπορεί να ποικίλουν στην σύσταση σε φωσφολιπίδια, και στην παρουσία ελεύθερης χοληστερόλης (138).

Δισκοειδή σωματίδια rHDL έχουν παρατηρηθεί και στο πλάσμα ασθενών με οικογενή έλλειψη LCAT (141) με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Τα νεοσυντιθέντα δισκοειδή σωματίδια HDL επιπλέουν στην πυκνότητα μεταξύ 1.063 έως 1.21 g/ml, και έχουν διαμέτρους 130-240 Å και ύψος 40 με 50 Å. Τα συνθετικά σωματίδια rHDL των απολιποπρωτεϊνών και λιπιδίων έχουν την ίδια δισκοειδή μορφολογία, διαμέτρους 80-350 Å και ύψος 40 με 50 Å.

Οι διάφοροι μέθοδοι παρασκευής επιτρέπουν τον σχηματισμό δισκοειδών σωματιδίων που περιέχουν μόνο 4: 1, φωσφολιπίδιο: χοληστερόλη (σε μικρούς δίσκους) ή 2: 1, φωσφολιπίδιο: χοληστερόλη (σε μεγάλους δίσκους). Αυτές οι μοριακές αναλογίες είναι πολύ μεγαλύτερες της αναλογίας 1.3: 1 του φωσφολιπιδίου: χοληστερόλη, που παρατηρείται στην δισκοειδή νεοσυντεθείσα HDL (138).

2) Ενεργοποίηση του ενζύμου Ακυλοτρανφεράση της Λεκιθίνης-Χοληστερόλης (LCAT)

Ι) Δομή, λειτουργία, γενετική του ενζύμου LCAT

Το ένζυμο LCAT αποτελεί βασικό ένζυμο για την μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, γιατί είναι υπεύθυνο για την σύνθεση της πλειονότητας των εστέρων χοληστερόλης του πλάσματος (142, 143). Το LCAT καταλύει την εστεροποίηση των μορίων της χοληστερόλης της HDL και της LDL. Το LCAT αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για την ωρίμανση των δισκοειδών σωματιδίων της HDL σε σφαιρικά σωματίδια. Το ένζυμο LCAT, στους ανθρώπους εκκρίνεται από το ήπαρ, και κυκλοφορεί στο πλάσμα, είτε υπό ελεύθερη μορφή, είτε συνδεδεμένο με λιποπρωτεΐνες.

Το γονίδιο για το LCAT του ανθρώπου έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 16q (144) και δίνει αντίγραφο mRNA μεγέθους 1.5 κιλοβάσεων (145). Η ώριμη πρωτεΐνη αποτελείται από 416 αμινοξέα, και η υπολογιζόμενη μοριακή της μάζα είναι 47.1 KDa. Το πρωτογενές προϊόν της μετάφρασης του LCAT περιέχει μια υδρόφοβη αλληλουχία πεπτιδίου σήματος, μήκους 24 αμινοξέων που απομακρύνεται από την πεπτιδάση σήματος στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η πρωτεΐνη περιέχει 6 υπολλείμματα κυστεΐνης και 4 πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης. Πρόσφατα οι Peelmann et al (146) πρότειναν ένα μοριακό μοντέλο για την τριτοταγή δομή της LCAT του ανθρώπου, με βάση την δομική ομολογία του ενζύμου LCAT με τις λιπάσες. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι το ένζυμο LCAT ανήκει στην οικογένεια των υδρολασών με δομές α/β (α/β hydrolase fold family) (Εικόνα 15)**.** Η κεντρική περιοχή του ενζύμου LCAT αποτελείται από 7 β-πτυχωτές επιφάνειες, με 4 α-έλικες και βρόχους (loops) που συνδέουν τις β-δομές. Οι έλικες 3/4 και 5/6 είναι κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η καταλυτική τριάδα του LCAT ταυτοποιήθηκε με μεταλλαξιγένεση του LCAT σε συγκεκριμένες θέσεις, έκφραση των μεταλλαγμένων κατασκευών και μέτρηση της ενεργότητας των αντιστοίχων πρωτεϊνών (146). Η καταλυτική τριάδα περιλαμβάνει τα αμινοξέα σερίνη 181, ασπαρτικό οξύ 345 και ιστιδίνη 377. Τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη στη θέση 103 και λευκίνη στη θέση 182 συμμετέχουν στο σχηματισμό της κοιλότητας οξυανιόντος (oxyanion hole). Η αλληλεπίδραση του ενζύμου LCAT με τα λιποπρωτεϊνικά του υποστρώματα πιθανώς χρησιμοποιεί μια επιφανειακή περιοχή αναγνώρισης. Οι Peelman et al (147), βασιζόμενοι στην ομολογία του ενζύμου LCAT με τις λιπάσες, και στην χρήση μεταλλαγμένων μορφών του LCAT, ταυτοποίησαν την περιοχή της LCAT μεταξύ των αμινοξέων 50-74 ως την επιφανειακή περιοχή αναγνώρισης (LCAT lid) και χαρακτήρισαν τα λειτουργικά

υπολλείμματα της περιοχής αυτής. Τα συμπεράσματα συνοψίζονται στα εξής: 1) το αρωματικό αμινοξύ τρυπτοφάνη στην θέση 61 απαιτείται για την πλήρη ενζυμική ενεργότητα, 2) τα συντηρημένα αμινοξέα Arg52 και Lys53 πιθανώς συμμετέχουν στην αναδίπλωση (folding) της επιφανειακής περιοχής αναγνώρισης του LCAT (lid) και 3) η περιοχή των αμινοξέων 56-68 του LCAT μπορεί να εισχωρεί υπό γωνία σε μεμβράνες φωσφολιπιδίων και να τις αποσταθεροποιεί.

Το ένζυμο LCAT είναι ενεργό στην επιφάνεια των HDL και LDL, και οι ενεργότητες αυτές καλούνται α και β αντίστοιχα (148). Η α ενεργότητα της LCAT στην HDL απαιτεί την παρουσία των απολιποπρωτεϊνών A-I και A-IV, που δρουν ως ενεργοποιητές-συνπαράγοντες (19, 143, 149), ενώ οι πρωτεΐνες αυτές δεν απαιτούνται για την β-ενεργότητα του ενζύμου. Στο γονίδιο της LCAT ανακαλύφθηκαν διάφορες μεταλλάξεις (150). Οι πιο σοβαρές μεταλλάξεις προκαλούν οικογενή έλλειψη LCAT (familial LCAT deficiency- FLD), η οποία χαρακτηρίζεται από πρακτικά πλήρη έλλειψη ενζυματικής δράσης του ενζύμου LCAT στο πλάσμα. Πιο ήπιες γενετικές ανωμαλίες προκαλούν την ασθένεια μάτι ψαριού, (fish-eye disease- FED) και διατηρούν την β-ενεργότητα του ενζύμου LCAT στην LDL. Σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν FLD και FED επεκτείνονται από το αμινοξύ 5 έως το αμινοξύ 398 της πρωτεΐνης LCAT. Οι ασθενείς με FED εμφανίζουν θόλωμα του κερατοειδούς χιτώνος και υπολιποπρωτεϊναιμία. Οι μεταλλάξεις του ενζύμου LCAT που προκαλούν FLD ή FED απαντώνται σε διαφορετικές περιοχές στην τρισδιάστατη δομή του ενζύμου. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που προκαλούν FLD είναι συγκεντρωμένες κοντά στην καταλυτική τριάδα, ή επηρεάζουν συντηρημένες δομικές περιοχές του ενζύμου. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που προκαλούν FED απαντώνται στην εξωτερική υδρόφιλη επιφάνεια των αμφιπαθικών ελίκων. Αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν σε μικρότερο βαθμό την συνολική δομή του ενζύμου, αλλά είναι πιθανό ότι παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση του ενζύμου με τον συνπαράγοντά του, αποA-I, και/ή το υπόστρωμά του.

Εικόνα 15: Μερικό μοντέλο για την δομή των α/β υδρολασών του ενζύμου LCAT. Η κεντρική περιοχή του ενζύμου LCAT αποτελείται από ένα μείγμα επτά β-πτυχωτών δομών και τεσσάρων α-ελίκων και βρόχους (loops) που συνδέουν τις β-δομές. Τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας (Ser181, Asp345, His377) απεικονίζονται με κίτρινο χρώμα. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν οικογενή έλλειψη LCAT (FLD) απεικονίζονται με μπλε χρώμα και συγκεντρώνονται κοντά στην καταλυτική τριάδα, ή στην κεντρική περιοχή (core) της πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν την ασθένεια ματιού ψαριού (FED) απεικονίζονται με μωβ χρώμα και συναντώνται στην εξωτερική επιφάνεια των αμφιπαθικών ελίκων.

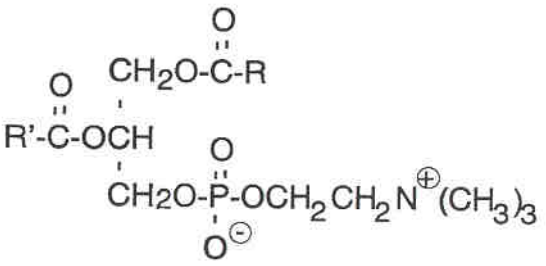
G344S
D345
T347M
H377
S181
Y156N
G183S
R147W
L209P
N391S
N131D
T123I

ΙΙ) Η αποΑ-Ι ως ενεργοποιητής του ενζύμου LCAT

Όπως αναφέρθηκε η HDL αποτελεί το κύριο υπόστρωμα για την εστεροποίηση της χοληστερόλης από το ένζυμο LCAT (107). Η αποΑ-Ι στην HDL αποτελεί τον κύριο φυσιολογικό ενεργοποιητή της ενεργότητας LCAT (19), κυρίως με τις φυσιολογικές λεκιθίνες, οι οποίες συνήθως περιέχουν μεγάλες αλυσίδες κεκορεσμένων λιπαρών οξέων εστεροποιημένων στη θέση 1 και ακόρεστων εστεροποιημένων στην θέση 2 της γλυκερόλης. Το LCAT αντιδρά με τα δισκοειδή και τα σφαιρικά σωματίδια της HDL, μεταφέροντας την 2-ακυλ-ομάδα της λεκιθίνης ή της φωσφατιδυλ-εθανολαμίνης στην ελεύθερη υδροξυλομάδα της χοληστερόλης, για την δημιουργία λυσολεκιθίνης και εστέρων χοληστερόλης, οι οποίοι μετακινούνται στον πυρήνα του σωματιδίου HDL (Εικόνα 16).

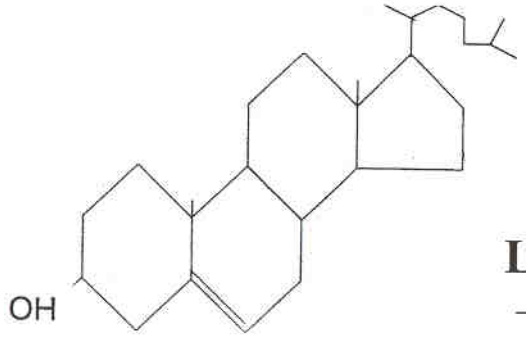
Η σχέση μεταξύ της σύστασης και της δομής του υποστρώματος και της ενζυματικής ενεργότητας του LCAT έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές. Η ταχύτητα κατάλυσης του LCAT επηρεάζεται από τα επιφανειακά χαρακτηριστικά των μορίων της λεκιθίνης περισσότερο από ότι επηρεάζεται από το μήκος της αλυσίδας της ακυλ-ομάδας. Έτσι λεκιθίνες με διαφορετικά μήκη και επίπεδα κορεσμού των αλυσίδων σε μεμβράνη φωσφατιδυλικού εθέρα έχουν παρόμοια ταχύτητα ενζυματικής αντίδρασης με το LCAT (151). Οι Rader et al (152) έδειξαν ότι κύριο υπόστρωμα του LCAT στο πλάσμα είναι κυρίως τα σωματίδια Lp(AI) (72%) και δευτερεύον τα σωματίδια Lp(AI-AII). Οι Jonas et al (153) και οι Sparks et al (154) έδειξαν ότι η ικανότητα ενεργοποίησης του LCAT από την αποΑ-Ι ήταν 10-φορές μεγαλύτερη στα δισκοειδή σωματίδια (μικρά και μεγάλα σωματίδια Lp(AI)), παρά στα σφαιρικά σωματίδια HDL. Η καταλυτική δράση του ενζύμου LCAT για τα υποστρώματά του ακολουθεί την σειρά δισκοειδή σωματίδια HDL >HDL_3>HDL_2>LDL (148). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ενζυματική δράση του LCAT αναστέλλεται στην λέμφο. Αυτό αποδόθηκε στην ασυνήθιστη στερεοδιαμόρφωση που έχει η αποΑ-Ι στα δισκοειδή σωματίδια HDL της λέμφου (155). Πρόσφατες μελέτες με χρήση βιοαισθητήρων (surface plasmon resonance biosensor) έδειξαν ότι η σύνδεση του φυσικού τύπου LCAT σε όλες τις λιποπρωτεΐνες έχει την ίδια σταθερά σύνδεσης. Όμως οι σταθερές αποσύνδεσης (kd) των υποστρωμάτων εξαρτώνται από την παρουσία της αποΑ-Ι στα σωματίδια HDL και το είδος των λιπιδίων της LDL (156). Η πρόσφατη μελέτη μεταλλαγμένων μορφών του LCAT έδειξε ότι το LCAT, σε αντίθεση με τις λιπάσες, αποδευσμεύεται από το υπόστρωμά του μεταξύ των καταλυτικών κύκλων (157).

Εικόνα 16: Χημική αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο LCAT. Η 2-ακυλ-ομάδα της λεκιθίνης ή της φωσφατιδυλο-εθανολαμίνης μεταφέρεται στην ελεύθερη υδροξυλομάδα της χοληστερόλης και δημιουργείται εστέρας χοληστερόλης (που κατακρατείται στην HDL) και λυσολεκιθίνη.



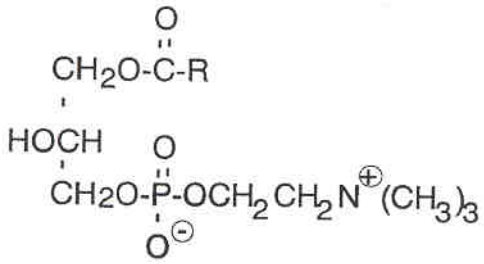
Λεκιθίνη

+



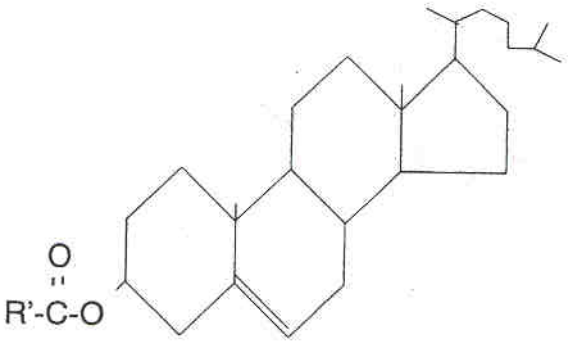
Χοληστερόλη

LCAT



Λυσολεκιθίνη

+



Εστέρας χοληστερόλης

Για την μελέτη της ύπαρξης μορίων-συμπαραγόντων στην αντίδραση του LCAT, χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα αρκετά συνθετικά σωματίδια, όπως διάφορα σωματίδια HDL, καθώς και σωματίδια rHDL. Βρέθηκε ότι διάφορες απολιποπρωτεΐνες (αποC-I, apoA-IV και αποE) μπορούν να ενεργοποιήσουν το LCAT σε δοκιμαστικό σωλήνα, αλλά καμία δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο η αποA-I (143, 149, 158). Η υποψία ότι η ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT απαιτεί την αλληλεπίδραση με την αποA-I έχει ενισχυθεί τα τελευταία χρόνια από την μελέτη φυσικών μεταλλάξεων της LCAT που προκαλούν FED, δηλαδή μειωμένη ενεργότητα στην HDL, αλλά κανονική ενεργότητα στην LDL. Οι Rosseneu et al (159, 160) προσπάθησαν να ταυτοποιήσουν την περιοχή του ενζύμου LCAT που ενεργοποιείται από την αποA-I, με χρήση φυσικών μεταλλάξεων και μεταλλαγμένων μορφών του LCAT και μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας των μορφών αυτών σε διάφορα υποστρώματα (μονομερικό υπόστρωμα, LDL, rHDL). Οι ερευνητές έδειξαν ότι τα αμινοξέα θρεονίνη 123 και φαινυλαλαλίνη 382 που βρίσκονται αμινοτελικά των ελίκων α 3-4 και της α Ιστιδίνης συμβάλλουν ειδικά στην αλληλεπίδραση του ενζύμου LCAT με την HDL και πιθανώς με την αποA-I. Επίσης τα αμινοξέα Asn131 και Asn391 είναι απαραίτητα για τον ιδανικό προσανατολισμό των 2 αμφιπαθικών ελίκων του LCAT, που είναι απαραίτητος για την αναγνώριση των λιποπρωτεϊνικών του υποστρωμάτων.

Από την άλλη μεριά διάφορα εργαστήρια χρησιμοποίησαν διαφορετικές μεθόδους, όπως φυσικά ή συνθετικά πεπτίδια αποA-I (161, 162), μονοκλωνικά αντισώματα (163, 164), μεταλλαξιγένεση (95, 165, 166) και δημιουργία διαφορετικών σωματιδίων HDL (167) σε μια προσπάθεια να καθοριστούν οι περιοχές ή τα υπολλείμματα της αποA-I που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Οι μελέτες αυτές συνοψίζονται στην συνέχεια.

Η χρήση συνθετικών πεπτιδίων που αντιστοιχούν σε διαφορετικά τμήματα της αποA-I έδειξε ότι οι περιοχές των αμινοξέων 148-185 και 121-164 της αποA-I συνδέονται σε φωσφολιπίδια και ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT (161, 162). Αντίθετα η περιοχή των αμινοξέων 200-243 είναι ικανή να συνδεθεί με φωσφολιπίδια, αλλά δεν μπορεί να ενεργοποιήσει το ένζυμο LCAT (168). Οι Segrest et al (161) πρότειναν ότι η τοπολογία των υπολλειμμάτων Glu στην μη πολική φάση της έλικας 2 (αμινοξέα 66-87) και έλικας 4 (αμινοξέα 99-120), η οποία δεν απαντάται σε άλλες απολιποπρωτεΐνες, μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ικανότητα της αποA-I να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT. Έτσι συνθετικά πεπτίδια που έχουν την ίδια τοπολογία των υπολλεμμάτων Glu βρέθηκε να είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση του

ενζύμου LCAT (161).

Άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν τμήματα της φυσικής αποA-I και έδειξαν ότι οι περιοχές των αμινοξέων 1-85 και 146-243 μπορούν να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT σε βαθμό 25-30% σε σχέση με τον φυσικό τύπο της αποA-I (25). Πιο αναλυτικές μελέτες έδειξαν ότι το τμήμα 1-192 της αποA-I μπορεί να σχηματίσει 2 διαφορετικά είδη δισκοειδών σωματιδίων, διαμέτρων 77 και 100 Å. Το LCAT έχει 5 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα (Vmax/Km) για το σωματίδιο των 77 Å σε σχέση με τα rHDL σωματίδια που περιέχουν τον φυσικό τύπο της αποA-I που έχουν διάμετρο 78 Å. Αντίθετα η δραστικότητα του ενζύμου LCAT ήταν μειωμένη κατά 50% για τα σωματίδια μεγαλύτερης διαμέτρου (100 Å) σε σχέση με τα σωματίδια διαμέτρου 96 Å που περιέχουν τον φυσικό τύπο (169).

Μελέτες με μονοκλωνικά αντισώματα έδειξαν ότι η ευρεία περιοχή της αποA-I, η οποία περιλαμβάνει κεντρικές και καρβοξυτελικές περιοχές, συμμετέχει στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Οι Meng et al (164) έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του LCAT αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό σε σωματίδια rHDL που περιέχουν 2, 3 ή 4 μόρια αποA-I ανά σωματίδιο, όταν χρησιμοποιηθούν αντισώματα για τις περιοχές 96-121, 135-148 και 149-186 της αποA-I. Προτάθηκε ότι πιθανώς η παρουσία των αντισωμάτων στην κεντρική περιοχή της αποA-I να αναστέλλει την αλληλεπίδρασή της αποA-I με το ένζυμο LCAT.

Η μεταλλαξιγένεση της αποA-I έδειξε ότι η σχετική ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από μορφές της αποA-I που περιέχουν σημειακές μεταλλάξεις, όπως Gln1, Gln2->Arg, Pro99->His, Pro121->His είναι περίπου το 106, 92 και 77% της ενεργοποίησης που επιτυγχάνεται με τον φυσικό τύπο αποA-I αντίστοιχα. Η μεταλλαγμένη μορφή της αποA-I (Pro165->Ala, Gln172->Glu) μειώνει την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT στο 55% σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I, ενώ η αποA-I που έχει ταυτόχρονη αντικατάσταση των Glu191, His193, Lys195 από αλανίνη ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT σε ποσοστό 110% σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I (95). Επιπλέον έγιναν μελέτες ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, που απαλοίφουν τις εσωτερικές περιοχές 113-124, 148-186, 212-233 και 212-243 και τα ποσοστά ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από τις εν λόγω μορφές ήταν 47, 0.5, 28 και 13 % αντίστοιχα της ενεργοποίησης που επιτυγχάνεται με τον φυσικό τύπο της αποA-I (165). Οι Sorci-Thomas et al (166) μελέτησαν εκτενέστερα την συμμετοχή των διαφόρων περιοχών της αποA-I στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, με ανάλυση μεταλλαγμένων μορφών που στερούνται τις διάφορες επαναλαμβανόμενες ακολουθίες 1

μέχρι 10 της αποA-I. Βρέθηκε ότι οι μορφές της αποA-I που φέρουν απαλοιφές των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών 6, 7 και 8 επιφέρουν την πιο δραστική μείωση στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, και ακολουθούν οι απαλοιφές των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών 2, 4, 9 και 10. Τέλος οι μορφές της αποA-I που φέρουν απαλοιφή των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών 1, 3 και 5 χαρακτηρίζονται από σχετικά πολύ μικρότερη επίπτωση στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT (166). Οι ίδιοι ερευνητές (170) έδειξαν ότι η αποA-I που φέρει αντικατάσταση της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας 6 (αμινοξέα 143-164) από την επαναλαμβανόμενη ακολουθία 10 (αμινοξέα 220-241) μειώνει κατά 5-6 φορές την καταλυτική δραστικότητα (Vmax/Km) του ενζύμου LCAT, σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I. Επίσης η αλλαγή του προσανατολισμού της υδροφοβικής φάσης της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας 6 (αμινοξέα 143-164) στην αποA-I οδηγεί σε μείωση ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT (171). Οι Doehst et al (172) έδειξαν ότι η αντικατάσταση της περιοχής 123-166 της αποA-I από έλικες της αποA-II (αμινοξέα 12-75) μειώνει κατά 27 φορές την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από την χιμαιρική πρωτεΐνη. Επίσης η απαλοιφή της Lys στη θέση 107 μειώνει κατά 40-60 % την ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT σε σχέση με τον φυσικό τύπο της αποA-I (173). Τέλος έχουν παρατηρηθεί μορφές της αποA-I που έχουν φυσικές μεταλλαγές, αποA-I Oslo (R160L), αποA-I Paris (R161C), αποA-I (P165R) και αποA-I Gienssen (Pro143->Arg) και έχουν μειωμένη κατά 40-70% ικανότητα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT, συγκριτικά με τον φυσικό τύπο της αποA-I (82, 174, 175).

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η αποA-I ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT δεν είναι ακόμη γνωστός. Έχει παρατηρηθεί ποσοτική αποδέσμευση του ενζύμου LCAT από την HDL σε διαλύματα άλατος (143). Με βάση τις υπάρχουσες παρατηρήσεις έχει προταθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μίας ή περισσότερες έλικες της πρωτεΐνης LCAT (έλικα α 3-4 και η έλικα α His) και μία ή περισσότερες έλικες της αποA-I μπορεί να φέρουν την αποA-I κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου LCAT και έτσι να συνεισφέρουν στην παρατηρούμενη ενεργοποίηση (146). Προς το παρόν είναι άγνωστο αν η αποA-I συμμετέχει άμεσα στον καταλυτικό μηχανισμό, ή στην αλλοστερική ενεργοποίηση του LCAT ή απλά διευκολύνει την πρόσβαση του ενζύμου LCAT στο υπόστρωμά του στην επιφάνεια της HDL. Οι υπάρχουσες μεταλλαγές της αποA-I δεν έχουν καταφέρει να δώσουν απάντηση στο ερώτημα αυτό.

Τα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευθεί από τα διάφορα ερευνητικά εργαστήρια δεν είναι πάντα δυνατόν να συγκριθούν μεταξύ τους, και η βασικότερη αιτία είναι ότι οι

μελέτες ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT έγιναν με υποστρώματα (rHDL) τα οποία ποικίλουν στα χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και διάμετρος) και την σύσταση σε λιπίδια. Τα διαφορετικά μεγέθη των σωματιδίων rHDL έχουν και διαφορετική ικανότητα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT. Συγκεκριμένα τα σωματίδια με διάμετρο 96 Å αποτελούν τα πιο αποτελεσματικά υποστρώματα. Τα μικρότερα σωματίδια είναι λιγότερο αποτελεσματικά υποστρώματα του ενζύμου LCAT. Αυτό έχει αποδωθεί στην διαφορετική στερεοδιαμόρφωση της αποA-I στα σωματίδια rHDL. Παρόλα αυτά το βασικό συμπέρασμα όλων των μελετών είναι ότι κάποιες περιοχές μέσα στις κεντρικές έλικες της αποA-I (έλικες 5-7) είναι σημαντικές και συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT.

Οι κινητικές της αντίδρασης του LCAT συνήθως περιγράφονται χρησιμοποιώντας το μοντέλο που έχει προταθεί από τον Verger et al (176), για την ερμηνεία της κινητικής της ενζυματικής κατάλυσης στις επιφάνειες λιποσωμάτων (interfaces). Το μοντέλο περιλαμβάνει δύο στάδια πριν από την κατάλυση. Το πρώτο στάδιο είναι η αναστρέψιμη ένωση του ενζύμου με την επιφάνεια του λιποσώματος. Το δεύτερο στάδιο είναι η αλληλεπίδραση του μοριακού υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο είναι ισοδύναμο με το κλασσικό σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος Michaelis-Menten. Όταν σχηματιστεί το σύμπλοκο, αρχίζει η καταλυτική διαδικασία, η οποία δημιουργεί ένζυμο που είναι ενωμένο στην επιφάνεια του σωματιδίου και απελευθερώνει τα προιόντα της αντίδρασης. Από πρόσφατες μελέτες πιστεύεται ότι το ένζυμο αποδεσμεύεται από την επιφάνεια πριν από τον επόμενο καταλυτικό κύκλο (157). Το φαινομενικό Km (Km_{app}) αντιπροσωπεύει την συγγένεια σύνδεσης του ενζύμου στο υπόστρωμα (rHDL), και οι τιμές του φαινομενικού Vmax ($Vmax_{app}$) αντιπροσωπεύουν την ενεργοποίηση του ενζύμου και τις σταθερές της κατάλυσης.

Το μοντέλο που έχει προταθεί και οι εξισώσεις που περιγράφουν τον καταλυτικό μηχανισμό φαίνονται παρακάτω

$$\mathbf{Vmax = Kcat.\ E_0.\ S\ /\ (S + Km^*)}$$

$$\mathbf{Km = Kd\ /\ Kp\ x\ Km^*\ .S\ /\ (S + Km^*)}$$

Όπου **Kp** είναι η σταθερή του ρυθμού διείσδυσης (penetration rate) (όγκος/επιφάνεια)

Kd είναι η σταθερή του ρυθμού αποπροσρόφησης (desorption rate) $(\text{χρόνος})^{-1}$

Km* είναι η σταθερή Michaelis Menten για το λιπόσωμα

Km* = $Kcat + K_{-1}/K_1$ (βλέπε διάγραμμα για τις τιμές αυτές)

Kcat είναι η καταλυτική σταθερά (catalytic rate constant) $(\text{χρόνος})^{-1}$

$\mathbf{E_0}$ είναι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου (μόρια/όγκο)

S είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος (μόρια/επιφάνεια)

3) Συμμετοχή των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποA-I στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης

Η ομοιόσταση της χοληστερόλης στον οργανισμό αποτελεί μια εξαιρετικά ρυθμιζόμενη λειτουργία και περιλαμβάνει την ενδοκυτταρική σύνθεση της χοληστερόλης, την είσοδο της χοληστερόλης στα κύτταρα μέσω υποδοχέων, την ενδοκυτταρική υδρόλυση και επανασχηματισμό εστέρων, την ενσωμάτωση της χοληστερόλης και των εστέρων της χοληστερόλης σε λιποπρωτεΐνες στο ήπαρ και το έντερο και την έκκρισή τους στο πλάσμα. Τέλος η έξοδος της ελεύθερης χοληστερόλης από τα κύτταρα των περιφερικών ιστών συντελεί στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ μέσω των λιποπρωτεϊνών. Τα (μη ηπατικά) περιφερικά κύτταρα μπορούν να συνθέσουν χοληστερόλη (τοπική σύνθεση), ή να προσλάβουν την χοληστερόλη κυρίως της LDL, μέσω των υποδοχέων της LDL. Η χοληστερόλη που συσσωρεύεται στα κύτταρα μπορεί να επανεστεροποιηθεί και να αποθηκευθεί σε μικρές ποσότητες υπό την μορφή σταγονιδίων εστέρων χοληστερόλης. Η περίσσεια χοληστερόλης των περιφερικών κυττάρων απομακρύνεται από το κύτταρο με το μηχανισμό της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης και μεταφέρεται μέσω του πλάσματος στο ήπαρ. Εκεί η χοληστερόλη ανακυκλώνεται στις νεοσυντεθείσες λιποπρωτεΐνες, ενώ μέρος της εκκρίνεται στη χολή, υπό την μορφή των χολικών οξέων. Η αποA-I, ως συστατικό της HDL, επάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα και μέσω του μηχανισμού αυτού πιστεύεται ότι συμβάλλει στην ομοιόσταση της χοληστερόλης στα κύτταρα και στους ιστούς (98, 177)**.**

Το αρχικό βήμα για την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης είναι η μεταφορά της χοληστερόλης από την κυτταρική επιφάνεια σε σωματίδια-δέκτες. Έχουν προταθεί 2 βασικοί μηχανισμοί για την εξήγηση του φαινομένου: α) Με παθητική διάχυση της ελεύθερης χοληστερόλης μέσω της υδατικής φάσης από την πλασματική μεμβράνη στην HDL ή άλλα μόρια-δέκτες της χοληστερόλης (178, 179) και β) Με σύνδεση της HDL σε πρωτεΐνες-υποδοχείς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου (HDL receptor cholesterol translocation and efflux)(26).

Η θεωρία της παθητικής διάχυσης της χοληστερόλης υποστηρίζεται από πολλαπλά πειράματα (180, 181) που έδειξαν ότι πολλές ουσίες που δρουν σαν δέκτες της χοληστερόλης δεν συνδέονται στα κύτταρα. Τέτοιες ουσίες είναι η νιτρισυλιωμένη HDL, σύμπλοκα αλβουμίνης-φωσφολιπιδίων και ακέραια ερυθροκύτταρα. Οι μελέτες αυτές υποστηρίζουν ότι υπάρχει αμφίδρομη ισορροπία μεταξύ της χοληστερόλης της μεμβράνης και της χοληστερόλης της HDL (178, 180, 182). Εντούτοις, μια απλή

διαδικασία υδατικής διάχυσης δεν μπορεί να εξηγήσει όλες τις πειραματικές παρατηρήσεις. Είναι γνωστό ότι η χοληστερόλη κατανέμεται ασύμμετρα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της πλασματικής μεμβράνης. Πιστεύεται επίσης ότι η ύπαρξη διαφορετικών μικροπεριοχών λιπιδίων, που έχουν διαφορετική σύσταση σε χοληστερόλη, οδηγεί στον σχηματισμό πολλαπλών διαμερισμάτων χοληστερόλης της πλασματικής μεμβράνης (183). Ο Rothblat (178) προτείνει ότι η έξοδος της χοληστερόλης από τα κύτταρα μπορεί να γίνει με παροδική σύνδεση μιας περιοχής της αποA-I (2 έλικες κοντά στο αμινοξύ 100) με περιοχές της μεμβράνης που έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε χοληστερόλη. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι ακόμη και αν υπάρχει περιορισμός στο ποσοστό αποπροσρόφησης (desorption) από την μεμβράνη, η πολύπλοκη κινητική συμπεριφορά της εξόδου της χοληστερόλης μπορεί να εξηγηθεί με διάχυση, αν ληφθεί υπόψιν ότι οι μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης με διαφορετικές ταχύτητες προσρόφησης (desorption) χαρακτηρίζονται από διαφορετική τοπική σύσταση λιπιδίων. Επίσης, ο Davidson (184) αναφέρει ότι η ικανότητα των σωματιδίων HDL να αποσπούν την χοληστερόλη από τα κύτταρα επηρεάζεται από την φυσική κατάσταση των φωσφολιπιδίων της. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του μήκους της ακυλομάδας του φωσφολιπιδίου και η αύξηση του κορεσμού χαρακτηρίζουν σωματίδια που είναι πιο αποτελεσματικοί δέκτες της ελεύθερης χοληστερόλης.

Πιστεύεται ότι η κυτταρική χοληστερόλη μεταφέρεται αρχικά σε μικρά σωματίδια HDL, που χαρακτηρίζονται από πρε-β-1 κινητικότητα, και περιέχουν μόνο αποA-I. Η χοληστερόλη που εξέρχεται από τα κύτταρα μεταφέρεται στον ενδιάμεσο χώρο (interstitial space). Η παρουσία της πρε-β-1 σε αυτό τον χώρο φανερώνει ότι ενδέχεται η πρε-β-1 HDL να παίζει ρόλο στην διαδικασία αυτή. Όταν όλη η αποA-I απομακρυνθεί από το πλάσμα με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, η ολική έξοδος της χοληστερόλης μειώνεται κατά 50%. Η έξοδος του υπολοίπου 50% της χοληστερόλης εξαρτάται από την παρουσία αλβουμίνης, πράγμα που υποδηλώνει ότι η αλβουμίνη αποτελεί τον πιθανό δέκτη κατά την έξοδο της χοληστερόλης από το κύτταρο με την μη-ειδική διαδικασία της διάχυσης.

Σύμφωνα με τον δεύτερο μηχανισμό, η έξοδος της χοληστερόλης από τα κύτταρα επιτυγχάνεται με την σύνδεση της HDL σε πρωτεΐνες-υποδοχείς. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει την σύνδεση της HDL σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων, μη παρεγχυματικών κυττάρων, ανθρώπινων ινοβλαστών και κυττάρων των επινεφριδίων, όπως και σε μεμβρανικά παρασκευάσματα από ήπαρ αερουραίου/σκύλου ή όρχεις αρουραίου (185). Διάφορες λιποπρωτεΐνες όπως HDL_3, HDL_2, HDL με αποE**,** LDL και VLDL**,** καθώς και

λιποσώματα που περιέχουν αποA-I**,** αποA-II και αποC's**,** αποA-IV ανταγωνίζονται σε κάποιο ποσοστό για την θέση σύνδεσης της HDL (185). Μελέτες αποτύπωσης συνδετών (ligand-blotting) έδειξαν ότι η HDL συνδέεται σε πρωτεΐνες μοριακής μάζας που ποικίλλει από 70-110 kDa (186-189). Έχει προταθεί ότι η σύνδεση της HDL σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας επάγει την μετατόπιση της χοληστερόλης από τις ενδοκυτταρικές μεμβράνες στην κυτταρική επιφάνεια μέσω ενός μονοπατιού μετάδοσης σήματος που εμπλέκει την πρωτεϊνική κινάση C (190).

Η ταυτοποίηση κυτταρικών υποδοχέων για την HDL έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων μελετών και οι προσπάθειες κλωνοποίησης ενός υποδοχέα για την HDL ήταν άκαρπες για πολλά χρόνια. Το 1996 το εργαστήριο του Δρα. Monty Krieger ταυτοποίησε τον υποδοχέα καθαριστή 'scavenger' SR-BI και έδειξε ότι ο υποδοχέας αυτός συνδέει με υψηλή συγγένεια την HDL μέσω της αποA-I (21, 118). Η σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI προάγει την επιλεκτική είσοδο των εστέρων χοληστερόλης στο ήπαρ και σε στεροειδογενείς ιστούς, για την σύνθεση στεροειδών ορμονών (119-121). Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να επάγει την έξοδο ελεύθερης χοληστερόλης από κύτταρα CHO (191, 192)**.** Πιστεύεται ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην μεμβρανική κυκλοφορία της χοληστερόλης, προκαλώντας ροή της χοληστερόλης και στις δύο κατευθύνσεις (193). Η δράση του υποδοχέα SR-BI περιγράφεται αναλυτικά στο επόμενο τμήμα της εισαγωγής.

Η αναγνώριση των σωματιδίων της HDL από πρωτεΐνες-υποδοχείς μπορεί να ακολουθήσει και μονοπάτι ενδοκύττωσης. Η ρετροενδοκύτωση της HDL έχει περιγραφεί σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (194, 195, 196) και είναι πιθανό να παίζει σημαντικό ρόλο στην έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα (196). Οι Takahashi et al (197) έδειξαν ότι σε μακροφάγα αρουραίου η HDL, που είναι είτε συνδεδεμένη με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase), ή με σίδηρο, εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα. Το σύμπλεγμα υποδοχέα-HDL ακολουθεί ένα μη λυσοσωματικό μονοπάτι μέσω του συστήματος trans-Golgi για την μεταφορά της HDL στο κυτόπλασμα και μετά επαναφορά της στην κυτταρική επιφάνεια. Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν ένα καινούριο ενδοκυτταρικό μηχανισμό δράσης της αποA-I, με βάση μελέτες σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων του ποντικού (196). Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό το κυκλικό AMP μπορεί να προκαλέσει δραματική αύξηση στην ενδοκυττάρωση της αποA-I, η οποία συνοδεύεται από επανέκκριση της πρωτεΐνης συνδεδεμένη με χοληστερόλη. Επίσης έχει δειχθεί ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί ενδοκύττωση όλου του σωματιδίου της HDL σε άλλους ιστούς και κυρίως στο ήπαρ και

στον εμβρυϊκό σάκο (198). Όπως αναφέρθηκε και πριν η κουβιλίνη αποτελεί υποδοχέα της HDL και της αποA-I, και μέσω ενδοκύττωσης προάγει την είσοδο της HDL σε ειδικευμένα όργανα, όπως νεφρό, έντερο, εμβρυϊκό σάκο και πλακούντα (132).

Τέλος η CERP, το προιόν του γονιδίου *ABC1*, αποτελεί μια σημαντικότατη μεμβρανική πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης και περιγράφεται αναλυτικά στην συνέχεια.

Όπως αναφέρθηκε και πριν η αποA-I, ως συστατικό της HDL, μπορεί να επάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα και αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης της χοληστερόλης (98, 177). Πρόσφατες μελέτες μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I έδειξαν ότι η καρβοξυτελική περιοχή, (αμινοξέα 209-243), είναι σημαντική για την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα (199, 200). Επίσης παρόμοιες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεολυτική τροποποίηση της αποA-I (με απαλοιφή της καρβοξυτελικής περιοχής της), από MMP (μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας) εμποδίζει την έξοδο της χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από κυτταρικές καλλιέργειες ανθρωπίνων μακροφάγων, αλλά όχι από ινοβλάστες (201). Οι μελέτες αυτές συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι η επεξεργασία της HDL με τρυψίνη μπορεί να αναστείλει την έξοδο της χοληστερόλης από κύτταρα (202). Αντίθετα η απαλοιφή μέρους των ελίκων 4-7 της αποA-I δεν φαίνεται να επιδρά στην παθητική έξοδο της χοληστερόλης από κυτταρικές καλλιέργειες ινοβλαστών (203).
Η ρυθμιστική πρωτεΐνη εξόδου χοληστερόλης (CERP), προϊόν του γονιδίου ABC1, συμμετέχει στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης-Σχέση της CERP (ABC1) με την νόσο του Tangier

Η νόσος του Tangier αποτελεί μια σπάνια γενετική διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από σχεδόν πλήρη έλλειψη χοληστερόλης στην HDL του πλάσματος, παρά την κανονική σύνθεση και την έκκριση της αποA-I (2). Οι ασθενείς με νόσο του Tangier εμφανίζουν συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης σε ειδικά κύτταρα και χαρακτηρίζονται από πρόωρη στεφανιαία νόσο, σε μερικούς φορείς των μεταλλάξεων. Τα κύτταρα των ατόμων με την νόσο του Tangier παρουσιάζουν προβλήματα στην κυτταρική έξοδο των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης (204). Αρχικές μελέτες της αποA-I σε ασθενείς με νόσο του Tangier έδειξαν ότι η πρωτεΐνη στο πλάσμα των ασθενών βρίσκεται κυρίως στη μορφή πρόδρομης αποA-I, που περιέχει 249 αμινοξέα, ενώ στα υγιή άτομα βρίσκεται στη μορφή της ώριμης αποA-I, που περιέχει 243 αμινοξέα (54). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει διαφορά στην μετατροπή της πρόδρομης προς την ώριμη μορφή της αποA-I σε υγιείς και ασθενείς με την νόσο του

Tangier. Η κλωνοποίηση του γονιδίου της αποA-I από ασθενείς με νόσο του Tangier επίσης έδειξε ότι τα δύο γονίδια δεν είχαν καμιά διαφορά μεταξύ τους (205). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις προτάθηκε ότι η μοριακή βάση της νόσου Tangier πρέπει να αναζητηθεί σε άλλες κατευθύνσεις που έχουν σχέση με την βιοσύνθεση ή τον καταβολισμό της HDL. Συγκεκριμένα η κλινική εικόνα της νόσου του Tangier είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην ανικανότητα της νεοσυντεθείσας πρωτεΐνης αποA-I να σχηματίσει δισκοειδή σωματίδια HDL, με αποτέλεσμα τον γρήγορο καταβολισμό της αποA-I και την μείωση των επιπέδων της HDL.

Τον τελευταίο χρόνο πέντε διαφορετικά εργαστήρια κλωνοποίησαν το γονίδιο ABC1 ως υπεύθυνο για την νόσο του Tangier (206-210). Το γονίδιο ABC1 κλωνοποιήθηκε αρχικά από το ποντίκι το 1999 (211) και πρόσφατα απομονώθηκε το ανθρώπινο ομόλογό του (212). Το ανθρώπινο γονίδιο ABC1 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 2201 αμινοξέων, μοριακής μάζας περίπου 220 kDa, που καλείται ρυθμιστική πρωτεΐνη εξόδου χοληστερόλης (cholesterol efflux regulatory protein-(CERP). Το γονίδιο ABC1 ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που έχουν συντηρηθεί εξελικτικά, και χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP για την μεταφορά μεγάλης ποικιλίας υποστρωμάτων διαμέσου των μεμβρανών. Μεταλλαγές σε άλλα μέλη της οικογένειας των ABC γονιδίων προκαλούν μια ποικιλία γενετικών διαταραχών, όπως κυστική ίνωση, ηπατική χολέστεση, εκφυλισμός των κηλίδων του ματιού (macular degeneration), δυσλειτουργίες των υπεροξεισωμάτων (peroxisome dysfunction) και σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας (213).

Παρόλο που η ασθένεια Tangier’s είναι μια σπάνια διαταραχή, (μόνο 40 άτομα έχουν διαγνωσθεί παγκοσμίως) η συσχέτιση του ABC1 με την στεφανιαία νόσο ενισχύθηκε από την ανακάλυψη ότι μεταλλαγές στο ABC1 απαντώνται επίσης και σε μια πιο κοινή γενετική διαταραχή, το σύνδρομο της οικογενούς έλλειψης HDL (familial HDL deficiency). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης HDL του πλάσματος και αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.

Μεταλλαγές στο γονίδιο ABC1 σχετίζονται με μεγάλα προβλήματα στην έξοδο της χοληστερόλης (213). Το γεγονός ότι τα κύτταρα ατόμων με ασθένεια Tangier έχουν μειωμένη ικανότητα εξόδου της χοληστερόλης υποδεικνύει την φυσιολογική σημασία της CERP στην έξοδο της χοληστερόλης ή των φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα. Είναι γνωστό ότι η απόκτηση λιπιδίων και φωσφολιπιδίων από την νεοσυντεθείσα HDL αποτελεί ένα βασικό και απαραίτητο βήμα για την διατήρηση και την ρύθμιση των επιπέδων της HDL στους ανθρώπους, και συνεπώς η δράση του CERP είναι βασική στο

αρχικό στάδιο της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Προς το παρόν υπάρχουν αρκετά ερωτήματα σχετικά με την δράση του προϊόντος του γονιδίου ABC1, την αλληλεπίδραση με πιθανούς συνδέτες, όπως η αποA-I, την ρύθμιση της έκφρασής του και τον πιθανό του ρόλο στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης.

4) Ρόλος της αποA-I ελεύθερης λιπιδίων στην έξοδο της κυτταρικής χοληστερόλης

Αρκετές μελέτες (214, 215, 216) έχουν δείξει ότι η καθαρή ελεύθερη λιπιδίων αποA-I μπορεί να διευκολύνει την ολική έξοδο χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από διάφορα κύτταρα, όπως μακροφάγα, ινοβλάστες, κύτταρα ενδοθηλίου (217) και κύτταρα CHO. Οι Forte et al (28, 218) μελέτησαν την ικανότητα της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I να αποσπά χοληστερόλη και φωσφολιπίδια από κύτταρα CHO και παρατήρησαν ότι η αποA-I επάγει τον σχηματισμό τριών βασικών σωματιδίων. Ο σχηματισμός αυτών των σωματιδίων εξαρτάται από τον χρόνο επώασης και την συγκέντρωση της αποA-I. Τα σωματίδια αυτά είναι δισκοειδή και έχουν μεγέθη 73, 90 και 110 Å. Προτάθηκε ότι η αρχική αλληλεπίδραση της αποA-I με την μεμβράνη οδηγεί στην απόσπαση φωσφολιπιδίων και τον σχηματισμό του πρώτου μικρού δισκοειδούς σωματιδίου (73 Å), που έχει μικρή περιεκτικότητα σε λιπίδια. Ακολούθως το σωματίδιο αυτό μπορεί να αποσπάσει επιπλέον χοληστερόλη και φωσφολιπίδια από την μεμβράνη, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεγαλυτέρων σωματιδίων αποA-I-λιπιδίων (διαμέτρων 90 και 110 Å). Αυτά τα σωματίδια που σχηματίζονται από την αποA-I μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την δράση του ενζύμου LCAT και αυτό οδηγεί στον σχηματισμό σωματιδίων 84 Å που μοιάζουν στο μέγεθος στην ανθρώπινη HDL_{3a} του πλάσματος (218). Αυτή η μελέτη επίσης έδειξε ότι η ελεύθερη λιπιδίων αποA-I που υπάρχει στο πλάσμα και το υγρό του ενδιάμεσου χώρου (interstitial fluid) μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό σωματιδίων Lp(AI), και με τον τρόπο αυτό μπορεί να επάγει την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Με βάση τις παραπάνω ενδείξεις έχει προταθεί ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η αποA-I μπορεί να αποδεσμευθεί, ως ελεύθερη μορφή, από τα σφαιρικά σωματίδια της α-HDL, κατά τον μετασχηματισμό τους με την επίδραση των πρωτεϊνών μεταφοράς και ενζύμων του πλάσματος (219). Ένα μέρος από την αποA-I μεταφέρεται από το πλάσμα στο υγρό του ενδιάμεσου χώρου, όπου και αποσπά φωσφολιπίδια από τις κυτταρικές μεμβράνες για τον σχηματισμό δισκοειδών σωματιδίων πρε-β-1 HDL. Η πρε-β-1 HDL αποσπά χοληστερόλη από τις κυτταρικές

κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε μεγαλύτερα δισκοειδή πρε-β-2 HDL (99). Η πρε-β-2 HDL μεταφέρεται στο πλάσμα όπου συνδέεται με το ένζυμο LCAT (99, 107). Η εστεροποίηση της χοληστερόλης δίνει στα δισκοειδή σωματίδια ένα πυρήνα εστέρων χοληστερόλης και τα σωματίδια μετατρέπονται σε σφαιρικά σωματίδια α-HDL (Εικ. 17).

5) Φυσικές μεταλλάξεις της αποA-I

Σε φυσιολογικά άτομα καθώς και σε ασθενείς έχουν περιγραφεί ποικίλες μεταλλάξεις της αποA-I, που περιέχουν κυρίως αντικαταστάσεις αμινοξέων και φαίνονται στον πίνακα 2. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις αυτές δεν επηρεάζουν την συγκέντρωση των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Όμως έχουν βρεθεί τουλάχιστον τρεις μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με μειωμένες συγκεντρώσεις χοληστερόλης της HDL του πλάσματος σε ετεροζυγωτικούς φορείς οι οποίες είναι οι εξής: αποA-I_{Milano} (Arg173→Cys), αποA-I (Pro165→Arg) και αποA-I_{Iowa} (Gly26→Arg) αλλά δεν σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Βρέθηκε ότι το αμινοτελικό κομμάτι της αποA-I_{Iowa} αποτελεί το βασικό συστατικό των αμυλοειδών ινιδίων σε μια γυναίκα που πάσχει από οικογενή πολυνευροπάθεια αμυλοειδούς (familial amyloid polyneuropathy).

Στην αποA-I_{Milano} το αμινοξύ αργινίνη στη θέση 173 έχει αντικατασταθεί από το αμινοξύ κυστεΐνη, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν υπάρχει στην αλληλουχία της αποA-I. Συνέπεια αυτής της αντικατάστασης είναι η μεταλλαγμένη μορφή να δημιουργεί διμερείς και μονομερείς μορφές στο πλάσμα, οι οποίες υπερκαταβολίζονται. Οι ασθενείς εμφανίζουν μερική έλλειψη της ενζυματικής δράσης του LCAT καθώς και μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από την αποA-I_{Milano}. Τα χαρακτηριστικά της σύνδεσης με λιπίδια της αποA-I_{Milano} είναι διαφορετικά από τον φυσικό τύπο της αποA-I. Έτσι, η αποA-I_{Milano} έχει αυξημένη ικανότητα σύνδεσης με φωσφολιπίδια, αλλά εμφανίζει ταχύτερη αποδέσμευση από τα ανασυγκροτημένα σωματίδια rHDL. Η μείωση στο ποσοστό της α-έλικας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάζει την σταθερότητα της σύνδεσης της αποA-I_{Milano} με την HDL.

Η μεταλλαγμένη μορφή αποA-I (Pro165→Arg) ανακαλύφθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ξηραμένου αίματος από 32.000 νεογνά στη Γερμανία. Μελέτες σε λιποκύτταρα ποντικού έδειξαν ότι συνθετικά παρασκευασμένα rHDL που περιέχουν αποA-I (Pro165→Arg) έχουν την ίδια συγγένεια σύνδεσης σε λιποκύτταρα, αλλά είναι 30-40% λιγότερο αποτελεσματικά στην ικανότητα να προάγουν την έξοδο της

χοληστερόλης από τα λιποκύτταρα, σε σύγκριση με rHDL που περιέχουν τον φυσικό τύπο της αποA-I (220).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟ Α-Ι

Μεταλλαγμένη μορφή αποA-I	Κλινικές και λειτουργικές επιπτώσεις	Βιβλιογραφία
Pro^{3}→Arg	Πρόβλημα μετατροπής της προ-αποA-I	221
Pro^{3}→His	Πρόβλημα μετατροπής της προ-αποA-I	221, 222
Pro^{4}→Arg		221, 222
Arg^{10}→Leu		223
Asp^{13}→Tyr		224
Gly^{26}→Arg (Iowa)	Οικογενής πολυνευροπάθεια αμυλοειδούς Χαμηλή χοληστερόλη HDL πλάσματος	225, 226
Asp89→Glu		81
Asp103→Asn		222
Απαλοιφή Lys 107 (Marburg, Munster-2)	Μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης LCAT Μειωμένο ποσό α-έλικας Μειωμένη σύνδεση με λιπίδια	**81** 227, 228 173
Lys107→Met		81
Glu110→Lys (Fukuoka)		229
Glu136→Lys		230
Glu139→Gly		81
Pro143→Arg (Giensen)	Μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης LCAT	175
Glu147→Val		81
Arg151→Cys (Paris)	Μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης LCAT	82
Ala158→Glu		230
Arg160→Leu (Oslo)	Μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης LCAT	174
Pro165→Arg	Χαμηλή χοληστερόλη HDL πλάσματος Μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης LCAT Μειωμένη ικανότητα εξόδου χοληστερόλης	220 221 174
Glu169→Gln		81
Arg173→Cys (Milano)	Χαμηλή χοληστερόλη HDL πλάσματος Μερική έλλειψη LCAT Μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης LCAT Μη φυσιολογικά σωματίδια HDL Τροποποίηση σύνδεσης με λιπίδια Ταχύτερος καταβολισμός πρωτεΐνης Ομοδιμερισμός και ετεροδιμερισμός	231, 232 233, 234 235, 236 83
Arg177→Cys		237
Glu198→Lys		237, 238, 81
Asp213→Gly		230
Glu235->0	Χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης HDL	200

(Nichinan)	Μειωμένη έξοδος χοληστερόλης από κύτταρα	

Οι μεταλλάξεις της αποA-I στις οποίες η προλίνη στη θέση 3 έχει αντικατασταθεί από αργινίνη ή ιστιδίνη (πίνακας 2) σχετίζονται με αυξημένες συγκεντρώσεις της μορφής προ-αποA-I. Στις μεταλλαγμένες αυτές μορφές προφανώς πραγματοποιείται πιο αργή μετατροπή της προ-αποA-I στην ώριμη μορφή αποA-I (221).

Τέλος έχουν περιγραφεί και οι φυσικές μεταλλάξεις της αποA-I, οι οποίες οδηγούν σε μειωμένη ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT (Πίνακας 2).

6) Μοριακές βλάβες που οδηγούν στην έλλειψη της αποA-I και της HDL

Για την μελέτη των μοριακών βλαβών που οδηγούν σε μειωμένες ή μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις της χοληστερόλης της HDL του ορού και της αποA-I χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς από επτά οικογένειες. Οι μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν είτε αναστέλλουν την σύνθεση της αποA-I και της HDL, είτε οδηγούν σε σύνθεση πρωτεϊνών με δραματικά τροποποιημένη δομή και φαίνονται στον πίνακα 3. Στην παραπάνω κατηγορία ανήκουν και οι μοριακές βλάβες που προκαλούν την νόσο του Tangier, η οποία έχει περιγραφεί αναλυτικά ανωτέρω.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Μοριακές βλάβες που οδηγούν στην έλλειψη της αποA-I και της HDL

Μετάλλαξη στην αποA-I	**Κλινικές και λειτουργικές επιπτώσεις**	**Βιβλιογραφία**
Τερματικό κωδικόνιο στο Αμινοξύ Gln 84	Ελλειψη της αποA-I Αθηρωμάτωση	239
Αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης στο αμινοξύ Thr 202 (προσθήκη 27 αμινοξέων)	Ελλειψη της αποA-I Θόλωμα του κερατοειδούς χιτώνος	240
Απαλοιφή 45 νουκλεοτιδίων (αμινοξέα 146-160)	Ελλειψη της αποA-I Μερική έλλειψη της LCAT	34
Απαλοιφή του γονιδιακού συμπλέγματος αποA-I, αποC-III, αποA-IV	Ελλειψη των αποA-I, C-III, A-IV Έλλειψη της HDL Αθηρωμάτωση	241 242 31
Αναστροφή εντός του γονιδιακού συμπλέγματος αποA-I, αποC-III, αποA-IV	Ελλειψη των αποA-I, C-III Έλλειψη της HDL Αθηρωμάτωση	241, 242, 31 243

7) Μελέτη του ρόλου της αποA-I και άλλων πρωτεϊνών στον μεταβολισμό της HDL και την αθηρωμάτωση με βάση μελέτες διαγονιδιακών ζώων

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μοντέλα ζώων που υπερεκφράζουν ή δεν εκφράζουν τα γονίδια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Το ποντίκι αποτελεί το κυριώτερο ζωϊκό μοντέλο, ενώ επίσης χρησιμοποιήθηκαν κουνέλια και κοτόπουλα.

Το διαγονιδιακό ποντίκι που υπερεκφράζει το ανθρώπινο γονίδιο της αποA-I ήταν το πρώτο μοντέλο που δημιουργήθηκε με σκοπό την κατανόηση του ρόλου της αποA-I στον μεταβολισμό της HDL (244, 245). Τα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν αποA-I έχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στην HDL και τα σωματίδια της HDL μοιάζουν με τα σωματίδια Lp(AI), που απαντώνται στο ανθρώπινο πλάσμα. Επιπλέον η υπερέκφραση του ανθρωπίνου γονιδίου της αποA-I σε ένα στέλεχος ποντικού, το C57BL/6, που εμφανίζει ευαισθησία στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης, δρα προστατευτικά ενάντια στην δημιουργία αθηρωματικών αλλοιώσεων, όταν τρέφονται με δίαιτα με μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης και κεκορεσμένων λιπών, σε σύγκριση με τα μη διαγονιδιακά ποντίκια που τρέφονται με την ίδια διατροφή (35). Διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο της αποE (αποE -/-) είναι ευαίσθητα στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης. Η έκταση της αθηρωμάτωσης και η ταχύτητα με την οποία αναπτύσσεται μειώνεται στα αποE -/- ποντίκια, τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο της αποA-I (αποE -/- x αποA-I +/+) (246). Επίσης η υπερέκφραση του γονιδίου της αποA-I του ανθρώπου σε κουνέλια αναστέλλει την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης, ακόμη και μετά από διατροφή με υψηλή ποσότητα χοληστερόλης (36).

Σε άλλες μελέτες διαγονιακά κουνέλια για το ανθρώπινο γονίδιο της αποA-I διασταυρώθηκαν με κουνέλια Watanabe, τα οποία έχουν μη λειτουργικό υποδοχέα της LDL (247). Τα κουνέλια A-I/Watanabe είχαν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στην HDL, σε σχέση με τα αρχικά κουνέλια Watanabe. Αυτό οδήγησε σε 40% μείωση του σχηματισμού λιπωδών εναποθέσεων (fatty streak) στις θωρακικές αορτές, και σε αύξηση στο βαθμό επιβίωσης των κουνελιών A-I/Watanabe, σε σχέση με τα αρχικά κουνέλια Watanabe. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την προστατευτική δράση της αποA-I στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω πειράματα οι Li et al (38) δημιούργησαν ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο της αποA-I (αποA-I -/-). Τα ποντίκια αυτά δεν ανέπτυξαν αθηρωμάτωση, παρόλο που η συγκέντρωση της χοληστερόλης της HDL ήταν μειωμένη σε ποσοστό 25%, σε σχέση με τα κανονικά ποντίκια. Η χοληστερόλη της HDL μειώθηκε

ακόμη περισσότερο όταν τα ποντίκια εκτράφησαν με διατροφή με υψηλή συγκέντρωση λιπαρών και χοληστερόλης επί 15 εβδομάδες, αλλά δεν εμφανίστηκαν αθηρωματικές αλλοιώσεις. Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι ότι στα αποA-I -/- ποντίκια αυξάνονται οι πρωτεΐνες αποE και αποA-IV, οι οποίες συνδέονται με την HDL. Είναι γνωστό ότι και οι δύο αυτές πρωτεΐνες επάγουν την έξοδο της χοληστερόλης από το κύτταρο, και μπορεί να είναι μερικώς υπεύθυνες για την πρόληψη της αθηρωμάτωσης στα ποντίκια αποA-I -/- (248).

Συμπερασματικά τα πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια και ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο της αποA-I έδωσαν αντιφατικές απαντήσεις. Τα διαγονιδιακά ποντίκια της αποA-I έδειξαν ότι η υπερέκφραση του αποA-I δρα προστατευτικά ενάντια στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης, ενώ αντίθετα η απενεργοποίηση του γονιδίου της αποA-I (αποA-I -/-), δεν είναι ικανή να προκαλέσει αθηρωμάτωση ακόμη και μετά από διατροφή, που προάγει την αθηρογένεση. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι ο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η αποA-I και η HDL μπορεί να συνεισφέρουν στην προστασία έναντι στην αθηρωμάτωση είναι με το να αντισταθμίζει τις επιδράσεις των άλλων αθηρογενετικών λιποπρωτεϊνών. Για την ερεύνηση της υπόθεσης αυτής, οι Huang et al (39) διασταύρωσαν διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν το γονίδιο της ανθρώπινης αποB, τα οποία έχουν αυξημένα επίπεδα LDL στο πλάσμα, με ποντίκια που δεν εκφράζουν το ανθρώπινο γονίδιο της αποA-I (αποA-I -/-). Σε σχέση με τα ποντίκια που εκφράζουν αποB και διατηρούν το γονίδιο της αποA-I (ΑποB x ΑποA-I +/+), τα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την αποB και δεν εκφράζουν αποA-I (ΑποB x ΑποA-I -/-), αναπτύσσουν 180 σε 300% μεγαλύτερες λιπώδεις εναποθέσεις και αλλοιώσεις όταν τραφούν με αθηρογενετική διατροφή. Αυτά τα συμπεράσματα συμφωνούν με την προτεινόμενο προστατευτικό ρόλο της αποA-I και HDL ενάντια στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης.

Οι Schultz et al (249) ανέπτυξαν στο στέλεχος C57BL/6 διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τις αποA-I και αποA-II, με σκοπό να μελετηθεί αν οι δύο πληθυσμοί λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων Lp(AI) και Lp(AI/AII) επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην αθηρογένεση. Τα ποντίκια εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα των ανθρώπινων αποA-I και αποA-II και της χοληστερόλης της HDL. Ο κύριος υποπληθυσμός της HDL είναι η Lp(AI/AII). Η σύγκριση των (ΑποA-I x ΑποA-II) διαγονιδιακών ποντικών, με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την αποA-I, στα οποία ο κύριος πληθυσμός της HDL είναι η Lp(AI), έδειξε ότι μετά από 36 εβδομάδες σε αθηρογενετική διατροφή, τα (ΑποAI x ΑποAII) ποντίκια ανάπτυξαν 15 φορές μεγαλύτερη επιφάνεια αθηρωματικών

αλλοιώσεων σε σχέση με τα αποA-I +/+ ποντίκια. Δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις της αποA-I και της χοληστερόλης της HDL είναι παρόμοιες στις δύο ομάδες ζώων, η ευαισθησία στην αθηρωμάτωση απεδώθη κυρίως στην παρουσία της ανθρώπινης αποA-II. Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν ότι η αποA-II μπορεί να αναστέλλει τις αντι-αθηρογενετικές ιδιότητες της αποA-I.

Τα ποντίκια που δεν εκφράζουν αποA-I (αποA-I-/-) χαρακτηρίζονται από μειωμένες συγκεντρώσεις εστέρων χοληστερόλης του πλάσματος (70%) και συνολικά μειωμένη σύνθεση εστέρων χοληστερόλης (60%). Η μειωμένη σύνθεση των εστέρων χοληστερόλης σε ομόζυγα ποντίκια που δεν εκφράζουν την αποA-I, οφείλεται κυρίως στην απουσία της αποA-I και επακόλουθη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας του LCAT και μερικώς στην μείωση διαθέσιμων σωματιδίων-υποστρωμάτων HDL (250). Οι Melchior et al (251) έδειξαν ότι η έκφραση του CETP σε ποντίκια C57BL/6 προκαλεί σημαντική μείωση στα επίπεδα της HDL και τον χρόνο ημίσσειας ζωής της αποA-I στο πλάσμα. Ακολούθως πρότειναν ότι η υπερέκφραση του CETP εμπλουτίζει τον πυρήνα της HDL με τριγλυκερίδια, και με τον τρόπο αυτό την καθιστά ευαίσθητη σε λιπόλυση, προκαλώντας την αποσύνδεση της αποA-I από τα σωματίδια της HDL. Η ελεύθερη αποA-I στη συνέχεια προσλαμβάνεται και καταβολίζεται από το νεφρό. Διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τα ανθρώπινα γονίδια CETP και αποA-I αναπτύχθηκαν από τους Francone et al (252). Η ταυτόχρονη έκφραση των διαγονιδίων CETP και αποA-I επιφέρει αύξηση του ποσοστού της αποA-I που κατανέμεται στους υποπληθυσμούς πρεβ-HDL (αύξηση κατά δύο φορές), HDL_{3a} (αύξηση κατά 1.4-φορές) και HDL_{3c} (αύξηση κατά 2.2-φορές). Το πλάσμα από τα CETP/αποA-I ποντίκια έχει μεγαλύτερη ικανότητα να επάγει την εστεροποίηση της χοληστερόλης, μέσω του ενζύμου LCAT, και να προάγει την έξοδο της χοληστερόλης από ινοβλάστες, σε σύγκριση με το πλάσμα που προέρχεται από τα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την αποA-I.

Η υπερέκφραση του LCAT σε ποντίκια, κουνέλια και πιθήκους αυξάνει τις συγκεντρώσεις της χοληστερόλης της HDL και της αποA-I του πλάσματος ανάλογα με την δόση του γονιδίου (253, 254, 255, 256). Στα κουνέλια και στους πιθήκους η αύξηση της HDL σχετίζεται με μείωση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποB. Επιπλέον οδηγεί σε μείωση των αθηρωματικών αλλοιώσεων, μετά από διατροφή πλούσια σε χοληστερόλη και κεκορεσμένα λίπη (257). Αντίθετα στα διαγονιδιακά ποντίκια παρατηρείται αύξηση της έκτασης των αθηρωματικών αλλοιώσεων κατά 1.8 - 3.5 φορές, μετά από την αθηρογενετική διατροφή. Τα διαγονιδιακά ποντίκια έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις μεγάλων, μη λειτουργικών σωματιδίων HDL. Η αθηρογενετική επίδραση της

υπερέκφρασης του ενζύμου LCAT σε ποντίκια αποδόθηκε στην απουσία ενεργότητας CETP. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι νεοσχηματιζόμενοι εστέρες χοληστερόλης να συσσωρεύονται στην HDL, και να μην μεταφέρονται στην LDL (255). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με άλλα πειράματα που έδειξαν ότι η υπερέκφραση της ηπατικής λιπάσης, ή του CETP, σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το LCAT, δημιουργεί πιο φυσιολογικά σωματίδια HDL και μειώνει την αθηρωμάτωση που επάγεται από την διατροφή (255, 258). Τα ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο του LCAT (LCAT -/-) (259), αποτελούν καλά μοντέλα για την ανθρώπινη διαταραχή έλλειψης του LCAT. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης, χοληστερόλης της HDL και αποA-I. Επίσης μετά από διατροφή πλούσια σε λιπαρά και χοληστερόλη, τα ποντίκια παρουσιάζουν αύξηση των αθηρογενετικών λιποπρωτεϊνών, που περιέχουν αποΒ και προδιαθέτουν σε αθηρωμάτωση. Έχει προταθεί ότι το LCAT μπορεί να συμμετέχει στον μετασχηματισμό των λιποπρωτεϊνών σαν φυσιολογική απάντηση στην πρόσληψη της χοληστερόλης από την διατροφή (259).

Τέλος η σημασία της PLTP στην κατανομή και λειτουργία των υποπληθυσμών της HDL, επιβεβαιώθηκε από δύο πρόσφατες μελέτες σε πειραματόζωα. Οι Albers et al (260) μελέτησαν 15 καθαρόαιμα (inbred) στελέχη ποντικών και έδειξαν ότι η PLTP σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τα φωσφολιπίδια του πλάσματος, τα φωσφολιπίδια της HDL, την χοληστερόλη της HDL και το ποσοστό των μεγάλων σωματιδίων της HDL. Οι Jiang et al (114) δημιούργησαν ποντίκια που δεν εκφράζουν την PLTP (PLTP -/-) και έδειξαν ότι η PLTP αποτελεί τον βασικό παράγοντα που διευκολύνει την μεταφορά των φωσφολιπιδίων της VLDL στην HDL. Η μειωμένη δράση της PLTP στο πλάσμα μειώνει δραματικά τα επίπεδα των λιπιδίων και των απολιποπρωτεϊνών της HDL. Αυτό φανερώνει ότι η μεταφορά των επιφανειακών συστατικών των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια είναι σημαντική για την διατήρηση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά προτάθηκε ότι η απενεργοποίηση της PLTP, μπορεί να προδιαθέτει σε αθηρογένεση, μετά από διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και κεκορεσμένα λίπη. Η PLTP μπορεί να συνδεθεί με την αποA-I στην HDL, και πρόσφατες μελέτες ταυτοποίησαν την αμινοτελική περιοχή της αποA-I (κοντά στα αμινοξέα 27-48) ως περιοχής σύνδεσης στην PLTP (261).

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) και η ηπατική λιπάση (HL) αποτελούν μέλη της οικογένειας των λιπασών της τριακυλογλυκερόλης, που επηρεάζουν τον μεταβολισμό της HDL. Μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι τα επίπεδα και οι ισότυποι της ηπατικής λιπάσης επηρεάζουν την κατανομή των διαφόρων υποπληθυσμών της HDL (109). Η

υπερέκφραση του γονιδίου της ηπατικής λιπάσης σε ποντίκια μειώνει τα επίπεδα της HDL (262), ενώ η απενεργοποίηση του γονιδίου της ηπατικής λιπάσης οδηγεί σε μέτρια αύξηση των επιπέδων της HDL, και την αύξηση 2-3 φορές της ολικής χοληστερόλης (263). Υπερέκφραση της ηπατικής λιπάσης σε στέλεχη ποντικών που δεν εκφράζουν το γονίδιο για την ανθρώπινη αποΕ (αποΕ -/-)(264) προστατεύει τα ποντίκια από αθηρωμάτωση. Τέλος η απενεργοποίηση της ηπατικής λιπάσης σε ποντίκια επάγει την έκφραση του υποδοχέα SR-BI (125), και έχει προταθεί ότι η δράση της ηπατικής λιπάσης στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν αποA-I μπορεί να διευκολύνει την επιλεκτική δέσμευση της HDL από τον υποδοχέα SR-BI κατά την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης.

3) ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΘΑΡΙΣΤΕΣ (SCAVENGER RECEPTORS)

Α) Ανακάλυψη υποδοχέων καθαριστών (scavenger)

Οι υποδοχείς καθαριστές (scavenger receptors) αποτελούν πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες συνδέονται σε χημικά τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες, όπως οξειδωμένη ή ακυλιωμένη LDL (265). Η ύπαρξή τους ταυτοποιήθηκε αρχικά στα μακροφάγα, από τους Brown, Goldstein και τους συνεργάτες τους (7, 266) στα πλαίσια της μελέτης πιθανών μηχανισμών που προκαλούν την εναπόθεση της χοληστερόλης της LDL σε μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα. Η εναπόθεση της χοληστερόλης σε μακροφάγα που εισχωρούν κάτω από το ενδοθήλιο αποτελεί το αρχικό στάδιο σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας στους ανθρώπους. Έτσι προτάθηκε το μοντέλο των υποδοχέων καθαριστών (scavenger receptors) των μακροφάγων (7, 265, 267, 268), σύμφωνα με το οποίο η LDL εισέρχεται στο αρτηριακό τοίχωμα, τροποποιείται χημικά (π. χ. με οξείδωση), πιθανώς λόγω τοπικών αντιδράσεων φλεγμονής. Εν συνεχεία η τροποποιημένη LDL αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς καθαριστές (scavenger) στην επιφάνεια των μακροφάγων. Ακολουθεί ενδοκύτωση της τροποποιημένης λιποπρωτεΐνης και αποικοδόμησή της στα λυσοσώματα. Αυτό συντελεί στην συσσώρευση των λιπιδίων στα κύτταρα και την τελική μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα, που είναι πλούσια σε σταγονίδια λιπιδίων, και έχουν εξαιρετικά παρόμοια μορφολογία με την μορφολογία των μακροφάγων της αθηρωματικής πλάκας. Σε αντίθεση με τον υποδοχέα της LDL, η δράση των υποδοχέων καθαριστών (scavenger) δεν ρυθμίζεται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση χοληστερόλης. Το μοντέλο του υποδοχέα καθαριστή (scavenger) εξακολουθεί να έχει μεγάλη αποδοχή, αλλά η ορθότητά του βρίσκεται ακόμη υπό έρευνα (269). Σύμφωνα με το μοντέλο αναμένεται ότι η επώαση των αφρωδών κυττάρων (μακροφάγων) με δέκτες όπως ορό ή HDL μπορεί να προάγει την έξοδο της κυτταρικής χοληστερόλης στο μόριο δέκτη (270, 271). Το μοντέλο αυτό είναι συμβατό με τον ρόλο της HDL στην έξοδο της χοληστερόλης από τα αφρώδη κύτταρα και αυτή η δράση της HDL ενδέχεται να προστατεύει από την αθηρωμάτωση.

Β) Τάξεις υποδοχέων ‘καθαριστών’ (scavenger)- Ονοματολογία - Δράσεις-Λειτουργίες

Οι Brown et al ανακάλυψαν ότι οι υποδοχείς καθαριστές (scavenger receptors-SR) στα μακροφάγα αναγνωρίζουν και προσδένουν μια εξαιρετικά ευρεία κατηγορία μορίων-συνδετών (265, 266). Τέτοια μόρια αποτελούν οι χημικά τροποποιημένες πρωτεΐνες, όπως ακυλιωμένη ή οξειδωμένη LDL, η μαλυλιωμένη (maleylated) αλβουμίνη, αλλά όχι οι αντίστοιχες μη-τροποποιημένες πρωτεΐνες. Οι υποδοχείς καθαριστές (SR) αναγνωρίζουν και προσδένουν πολυριβονουκλεοτίδια, όπως πολυ G, πολυ I αλλά όχι πολυ A, πολυ T ή πολυ C, πολυσακχαρίτες όπως θειϊκή δεξτράνη (dextran sulfate), ανιονικά φωσφολιπίδια όπως φωσφατιδυλσερίνη και άλλα μόρια όπως θειϊκό πολυβινύλιο. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών πρόσδεσης συνδετών των υποδοχέων καθαριστών (SR) σε μακροφάγα και κύτταρα ενδοθηλίου οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχουν ποικίλες τάξεις τροποποιημένων υποδοχέων LDL (272-274). Μετά από την κλωνοποίηση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των πρώτων υποδοχέων καθαριστών των μακροφάγων SR-AI και SR-AII, το 1990, ακολούθησε η κλωνοποίηση cDNAs που κωδικοποιούν διαφορετικούς υποδοχείς καθαριστές (SR), οι οποίοι εκφράζονται σε πολλά διαφορετικά κύτταρα (265, 275-279). Είναι πολύ πιθανό να υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς καθαριστές (SR) που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη.

Ονοματολογία υποδοχέων καθαριστών (SR)

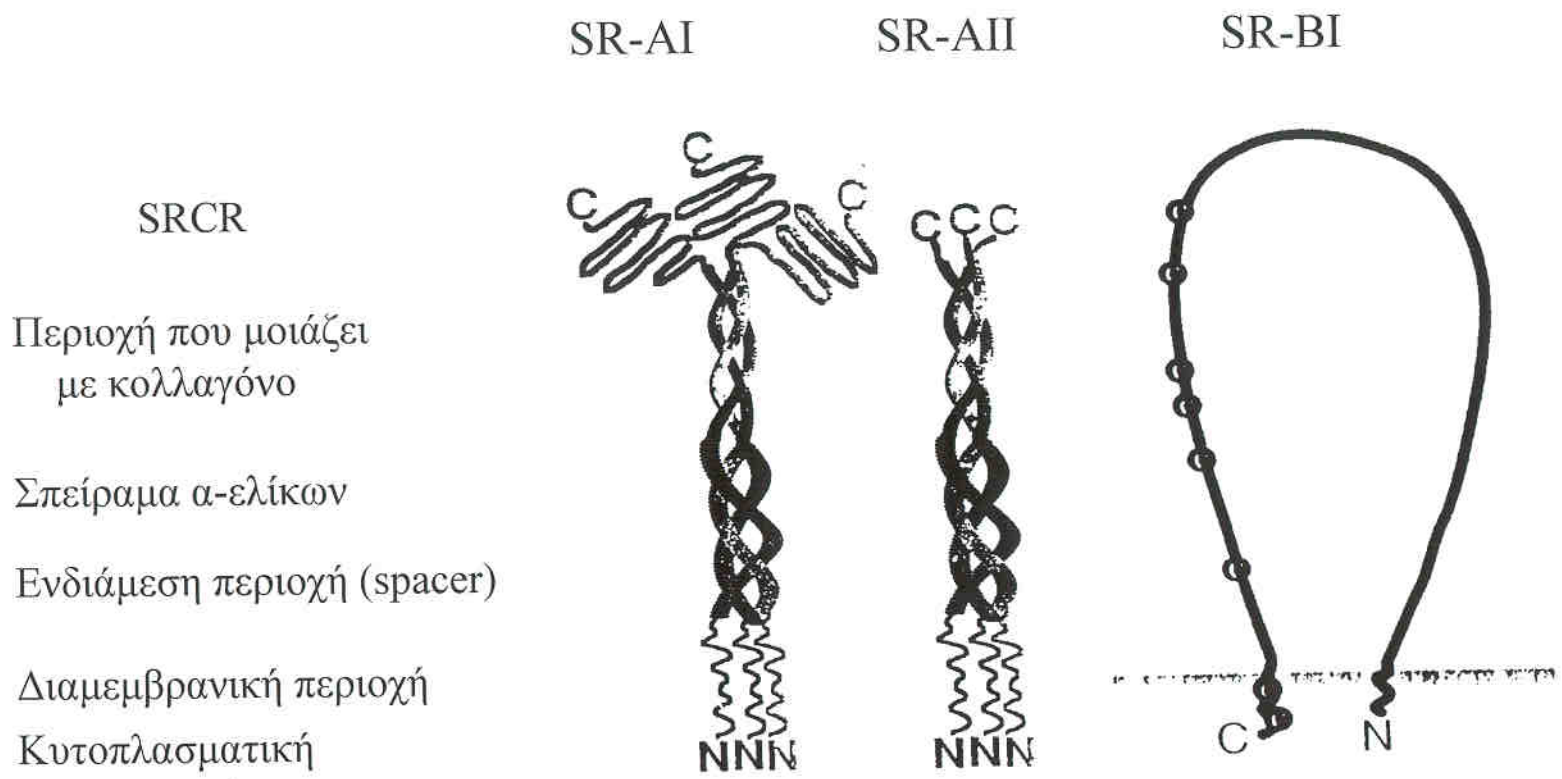
Κατωτέρω περιγράφεται η ονοματολογία για τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων καθαριστών ‘scavenger’: Τα μέλη με παρόμοιες αλληλουχίες DNA κατατάσσονται μαζί σε μια τάξη, η οποία καθορίζεται από κεφαλαίο γράμμα (πχ τάξη A, B, C). Μέσα σε μια τάξη οι επιμέρους πρωτεΐνες υποδοχείς χαρακτηρίζονται με ρωμαϊκό αριθμητικό. Έτσι οι πρώτοι υποδοχείς των μακροφάγων που ταυτοποιήθηκαν και αναλύθηκαν λεπτομερώς σε μοριακό επίπεδο (275, 276) ονομάζονται ‘SR-AI’ και ‘SR-AII’, που αντιστοιχούν σε ‘υποδοχέα καθαριστή, τάξη A, τύπος I’ (SR-AI) και ‘υποδοχέα καθαριστή, τάξης A, τύπος II’ (SR-AII). Μέσα σε μια καθορισμένη τάξη μπορούν να υπάρχουν διάφοροι τύποι υποδοχέων, είτε ως προϊόντα της εναλλακτικής εκτομής ιντρονίων του ίδιου γονιδίου (πχ SR-AI και SR-AII) ή ως προιόντα διαφορετικών γονιδίων (SR-CI και SR-CII) (279). Οι ομόλογοι υποδοχείς καθαριστές (SR) που προέρχονται από διάφορους οργανισμούς διακρίνονται χρησιμοποιώντας πρόθεμα μικρού γράμματος πριν από τα χαρακτηριστικά του υποδοχέα π.χ. ‘mSR-BI’ και ‘hSR-BI’ αντιπροσωπεύουν τον υποδοχέα SR-BI του ποντικού (mouse) και του ανθρώπου (human) αντίστοιχα. Στην περίπτωση που μια ήδη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη εμφανίζει ενεργότητα υποδοχέα καθαριστή (SR) έχει καθιερωθεί η πρωτεΐνη να ταξινομείται στην

αντίστοιχη τάξη των καθαριστών υποδοχέων (SR), για παράδειγμα η μεμβρανική πρωτεΐνη CD36 είναι ένας καθαριστής υποδοχέας (SR) τάξης B (278), και η MARCO είναι ένας καθαριστής υποδοχέας (SR) τάξης A (280).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τρεις τάξεις υποδοχέων καθαριστών (SR), οι SR-A (270, 275, 276), SR-B (278) και SR-C (279). Οι πρώτοι υποδοχείς καθαριστές (SR) που καθαρίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν είναι οι SR-AI και SR-AII των θηλαστικών. Οι SR-AI και SR-AII έχουν μελετηθεί σε διάφορα είδη, όπως βόδι, ποντίκι, άνθρωπο και κουνέλι. Οι SR-AI είναι επιμήκεις ομοτριμερείς μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από μονομερή 451-454 αμινοξέων. Το κάθε μονομερές αποτελείται από διάφορες περιοχές: μια μικρή αμινοτελική κυτοπλασματική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή, η οποία ακολουθείται από μια ενδιάμεση περιοχή (spacer), και στη συνέχεια από δομές σπειράματος α-ελίκων και δομές που μοιάζουν με κολλαγόνο. Οι περιοχές αυτές είναι ίδιες και στους δύο τύπους υποδοχέων. Το καρβοξυτελικό τμήμα του SR-AI αποτελείται από περιοχές που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη (μοτίβο SRCR) ενώ ο SR-AII περιέχει ένα μικρό πεπτίδιο 6-17 αμινοξέων, ανάλογα με το είδος του υποδοχέα. Πιστεύεται ότι οι α-έλικες σχηματίζουν μια μοναδική αριστερόστροφη υπερέλικα τριών-αλυσίδων, η οποία ενώνεται με την δεξιόστροφη τριπλή έλικα των περιοχών του κολλαγόνου για τον τελικό σχηματισμό ενός επιμήκους ινώδους μορίου. Παρατηρείται ότι όλοι οι υποδοχείς SR-AI περιέχουν συντηρημένα υπολλείματα κυστεϊνών (συνολικά 8), μία προλίνη στην διαμεμβρανική περιοχή (η οποία μπορεί να επιδρά στην δομή ή το πακετάρισμα των υποδοχέων) και 6 πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης. Παρά την απουσία του καρβοξυτελικού τμήματος, οι υποδοχείς SR-AII έχουν παρόμοια ειδικότητα πρόσδεσης μορίων που είναι επίσης συνδέτες των υποδοχέων SR-AI. Αυτό συνεπάγεται ότι η περιοχή SRCR (πλούσια σε κυστεΐνες) δεν απαιτείται για την ειδικότητα της πρόσδεσης ποικίλων συνδετών στους υποδοχείς SR-AI και SR-AII. Η δομή των υποδοχέων SR-AI και SR-AII φαίνεται στην εικόνα 17 (265). Οι SR-AI και SR-AII αποτελούν προϊόντα εναλλακτικής εκτομής ιντρονίων του ίδιου γονιδίου. Το γονίδιο του υποδοχέα SR-AI βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 τόσο στο ποντίκι (281), όσο και στον άνθρωπο (282). Οι υποδοχείς SR-A έχει προταθεί ότι συμμετέχουν στην άμυνα του ξενιστή και την κυτταρική προσκόλληση (adhesion), καθώς και στην αθηρογένεση.

Ο υποδοχέας SR-C κλωνοποιήθηκε από την Δροσόφιλα (*Drosophila melanogaster*) και απαντάται αποκλειστικά σε μακροφάγα/αιμοκύτταρα κατά την εμβυονική ανάπτυξη και δεν έχει ιδιαίτερη ομολογία στην αλληλουχία με τους άλλους

Εικόνα 17: Δομές των υποδοχέων καθαριστών (scavenger receptors), SR-AI, SR-AII και SR-BI. A, B: Οι υποδοχείς καθαριστές 'scavenger' τάξης Α, τύπου Ι και τύπου ΙΙ αποτελούνται από έξι περιοχές, από τις οποίες οι πέντε πρώτες περιοχές είναι ίδιες μεταξύ των δύο υποδοχέων. Αυτές είναι η αμινοτελική κυτοπλασματική περιοχή, η διαμεμβρανική περιοχή, η ενδιάμεση περιοχή (spacer), η περιοχή του σπειράματος α-ελίκων και οι περιοχές που μοιάζουν με κολλαγόνο. Η καρβοξυτελική περιοχή του τύπου Ι υποδοχέα αποτελείται από μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (SRCR), ενώ στον υποδοχέα τύπου ΙΙ απαντάται ένα μικρό ολιγοπεπτίδιο (6-17 αμινοξέων, ανάλογα με το είδος). **Γ:** Ο υποδοχέας SR-BI του ποντικού αποτελείται από μια μεγάλη εξωκυτταρική θηλιά (403 αμινοξέων), που πιθανώς δεσμεύεται στην πλασματική μεμβράνη σε κάθε μεριά με διαμεμβρανικές περιοχές (28 και 25 αμινοξέων), οι οποίες βρίσκονται δίπλα σε μικρές κυτοπλασματικές αμινοτελικές και καρβοξυτελικές περιοχές. Με κύκλους σημειώνονται οι σχετικές τοπολογίες των υπολλειμμάτων κυστεΐνης.


SR-AI
SR-AII
SR-BI
SRCR
Περιοχή που μοιάζει με κολλαγόνο
Σπείραμα α-ελίκων
Ενδιάμεση περιοχή (spacer)
Διαμεμβρανική περιοχή
Κυτοπλασματική περιοχή
C
N

υποδοχείς SR-A (279). Ο υποδοχέας SR-C αποτελεί τύπου Ι, μεμβρανική πρωτεΐνη που απαρτίζεται από 609 αμινοξέα. Πολλές περιοχές του SR-C έχουν κοινά μοτίβα με αλληλουχίες που ευρίσκονται σε περιοχές της πρωτεΐνης ελέγχου του συμπληρώματος (CCP -Complement Control Protein) και συμμετέχουν σε αντιδράσεις άμυνας του οργανισμού.

Οι υποδοχείς καθαριστές τάξης Β (SR-B) περιφράφονται πιο αναλυτικά στην συνέχεια.

Φυσιολογικές δράσεις των υποδοχέων καθαριστών (SR)

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω οι υποδοχείς καθαριστές (SR) λόγω της ικανότητας συσσώρευσης της χοληστερόλης στα κύτταρα μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης. Επιπλέον η παρουσία των ινωδών περιοχών και των περιοχών πλούσιων σε κυστεΐνη (SRCR) υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας (extracellular matrix). Αυτό δικαιολογεί την παρουσία των εν λόγω υποδοχέων στα μακροφάγα και όχι στα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα. Οι ιδιότητες των υποδοχέων καθαριστών (SR) να αναγνωρίζουν ευρύ πεδίο συνδετών και να εκφράζονται στα μακροφάγα τους καθιστούν πιθανά μόρια που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία (innate immunity). Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι υποδοχείς καθαριστές (SR) μπορεί να δρούν αναγνωρίζοντας και απομακρύνοντας από τους ιστούς και την κυκλοφορία παθογενείς ουσίες και μόρια. Οι υποδοχείς SRAI και SRAII συνδέονται σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναγνωρίζουν σε πειραματόζωα την βακτηριακή ενδοτοξίνη (ReLPS) (283). Οι υποδοχείς SRAI επίσης δεσμεύουν λιποτεχοϊκό οξύ (LTA) (284), που είναι ανιονικό πολυμερές στην επιφάνεια πολλών Gram θετικών βακτηρίων, καθώς και ακέραια Gram θετικά βακτήρια (S. aureus, Streptococcus pyogenes) όπως επίσης και το βακτήριο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*) (285). Η ενδοτοξίνη (βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης, LPS) αποτελεί το βασικό συστατικό των Gram αρνητικών βακτηρίων και επάγει τοξικό σόκ. Η ενδοτοξίνη αναγνωρίζεται και δεσμεύεται από την HDL (286), η οποία με την σειρά της δεσμεύεται από τον υποδοχέα SR-BI (118, 120, 121). Με τον τρόπο αυτό ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να δράσει προστατευτικά ενάντια στην ενδοτοξαιμία (endotoxinemia) και την βακτηριακή σέψη. Επιπλέον ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να επηρεάζει την κατανομή του LPS στους ιστούς, και με αυτό τον τρόπο να συμβάλλει στην οξεία ανεπάρκεια των επινεφριδίων, ή την αιμορραγία που παρατηρείται στην σοβαρή σέψη από Gram αρνητικά βακτήρια (287). Με βάση το γεγονός ότι οι υποδοχείς καθαριστές (SR) έχουν σημαντικές, καλά συντηρημένες

λειτουργίες που εμφανίζονται από τα εμβρυονικά μακροφάγα της *Drosophila Melanogaster* μέχρι τα μακροφάγα των θηλαστικών, πιστεύεται ότι αναπτύχθηκαν σχετικά νωρίς στην εξέλιξη για να προστατεύσουν τους πολυκύτταρους οργανισμούς από την ποικιλία των παθογόνων ουσιών. Οι υποδοχείς SR-A και SR-C περιέχουν διακριτές πρωτεϊνικές περιοχές, οι οποίες απαντώνται και σε πολλές άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις αντιδράσεις άμυνας του ξενιστή. Τέτοιες περιοχές είναι περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη των υποδοχέων SR-AI και MARCO καθώς και οι περιοχές που μοιάζουν με δομές του συμπληρώματος του υποδοχέα SR-CI. Επιπλέον διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν τους υποδοχείς SR-AI και SR-AII εμφανίζουν αυξημένη υπερευασισθησία σε μόλυνση από Gram θετικούς οργανισμούς, απλό ϊό έρπη (herpes simplex virus), καθώς και σε άμεση πρόκληση με ενδοτοξίνη (269).

Εκτός από τα εξωγενή παθογόνα, ο οργανισμός μπορεί να απειληθεί και από την δημιουργία κατεστραμμένου υλικού (π.χ. από οξείδωση, αποικοδόμηση ή γήρανση κυττάρων), όπως αλειωμένα μακρομοριακά σύμπλοκα καθώς και αποπτωτικά κύτταρα. Μελέτες σε δοκιμαστικό σωλήνα έδειξαν ότι οι υποδοχείς καθαριστές (SR) μπορεί να παίζουν ρόλο στην αναγνώριση και απομάκρυνση του ενδογενούς αυτού υλικού. Οι υποδοχείς καθαριστές (SR) έχει δειχθεί ότι μπορούν να αναγνωρίσουν αλβουμίνες με τροποποιημένη διαμόρφωση, κατεστραμμένα κύτταρα λόγω οξείδωσης, και αποπτωτικά κύτταρα (285, 288-291). Στην περίπτωση των υποδοχέων SR-BI και CD36, η αναγνώριση των κατεστραμμένων ή αποπτωτικών κυττάρων έχει αποδωθεί στην ικανότητά τους να συνδέονται σε ανιονικά φωσφολιπίδια (292). Για παράδειγμα η πρόσδεση των ανιονικών φωσφολιπιδίων, που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα CD36, οδηγεί στην φαγοκύτωση των εξωτερικών τμημάτων των ραβδίων κυττάρων του φωτοϋποδοχέα, μια λειτουργία απαραίτητη για την κανονική οπτική διαδικασία (293).

4) ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΘΑΡΙΣΤΕΣ ΤΑΞΗΣ Β

Α) CD36

Η πρωτεΐνη CD36 αποτελεί τον πρώτο υποδοχέα καθαριστή τάξης Β (SR-B) που ταυτοποιήθηκε από τους Endemann et al (294), με χρήση βιβλιοθήκης cDNA από μακροφάγα του ποντικού και τεχνικές κλωνοποίησης και έκφρασης σε κύτταρα COS. Προηγούμενα είχε κλωνοποιηθεί το cDNA για την πρωτεΐνη CD36 και είχε αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης. Η πρωτεΐνη CD36 αποτελείται από 472 αμινοξέα και μπορεί να συνδέεται σε ποικιλία μορίων όπως τροποποιημένη LDL (294), ανιονικά φωσφολιπίδια (292), εξωτερικά τμήματα των κυττάρων ραβδίων (rod outer segments) (293), λιπαρά οξέα μεγάλων αλυσίδων και κολλαγόνο (295). Ο CD36 εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς όπως λιπώδη ιστό και μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια και μεγάλο αριθμό κυτταρικών σειρών (295). Έχει αναφερθεί ότι ο CD36 συναθροίζεται σε ειδικευμένες περιοχές της πλασματικής μεμβράνης που καλούνται καβεόλα (caveolae) (296). Οι φυσιολογικές λειτουργίες του CD36 δεν έχουν καθοριστεί πλήρως. Μερικές από τις δράσεις του μπορεί να είναι οι εξής: μόριο προσκόλλησης (λόγω της ικανότητας σύνδεσης του με το κολλαγόνο), μόριο που συμμετέχει στην μετάδοση σήματος (295), μεταφορέας λιπαρών οξέων που φέρουν μεγάλες αλυσίδες, υποδοχέας για την φαγοκύτωση των εξωτερικών τμημάτων των κυττάρων ραβδίων (293), και υποδοχέας των μακροφάγων για τα κατεστραμμένα ή γηρασμένα ουδετερόφιλα κύτταρα. (285, 297). Πρόσφατως οι Febbraio et al έδειξαν ότι ο CD36 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αθηρωματικών αλλοιώσεων σε ζωντανούς οργανισμούς (298). Συγκεκριμένα διασταύρωσαν διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο του CD36 με ποντίκια που δεν εκφράζουν την αποΕ και παρατήρησαν ότι στα ποντίκια (CD36-/- x ΑποΕ -/-) υπάρχει μείωση στην περιοχή αθηρωματικών αλλοιώσεων στην αορτή (που ποικίλλει ανάλογα με την διατροφή) σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες, παρά το γεγονός ότι οι αλλαγές στα λιποπρωτεϊνικά προφίλ των διαγονιδιακών ποντικών συσχετίζονται με αυξημένη αθηρογένεση. Οι ερευνητές προτείνουν ότι η αναστολή της έκφρασης του CD36 είναι πιθανό να δράσει προστατευτικά ακόμη και σε πιο σοβαρές καταστάσεις προ-αθηρογένεσης.

Β) Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ SR-BI

Ι) Σημασία του υποδοχέα SR-BI

Ο υποδοχέας SR-BI αποτελεί τον πρώτο φυσιολογικό υποδοχέα της HDL, που δεσμεύει την HDL με υψηλή συγγένεια (118). Ο υποδοχέας SR-BI αναγνωρίζει την αποA-I και άλλες απολιποπρωτεΐνες της HDL (αποA-II, αποC-III) (21). Μετά από την σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI, τα κύτταρα προσλαμβάνουν επιλεκτικά εστέρες χοληστερόλης και η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της χοληστερόλης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου (118). Ο υποδοχέας SR-BI εκφράζεται κυρίως σε στεροειδογενείς ιστούς και στο ήπαρ (118, 122). Η υπερέκφραση του υποδοχέα SR-BI σε ποντίκια, μετά από επιμόλυνση με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς ή σε διαγονιδιακά ποντίκια ελαττώνει δραματικά τα επίπεδα της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος, αυξάνει τα επίπεδα της χοληστερόλης της χολής και αναστέλλει την αθηρωμάτωση (299-303). Η απενεργοποίηση του γονιδίου του SR-BI σε ποντίκια αυξάνει περισσότερο από δύο φορές τα επίπεδα της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος, χωρίς να επιδρά στα επίπεδα της αποA-I, αυξάνει το μέγεθος των σωματιδίων της HDL, μειώνει την περιεκτικότητα σε χοληστερόλη των επινεφριδίων, των ωοθηκών και της χολής (304, 305) και επιταχύνει την αθηρωμάτωση σε ποντίκια που δεν εκφράζουν αποE (αποE -/-) (305). Ο υποδοχέας SR-BI ρυθμίζει τα επίπεδα της χοληστερόλης της HDL σε ποντίκια και την έκκριση της χοληστερόλης της χολής. Τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν ότι ο υποδοχέας SR-BI παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της HDL στο ποντίκι, στην διαδικασία της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης και γενικά στην ομοιόσταση της χοληστερόλης όλου του σώματος. Η ηπατική έκφραση του υποδοχέα SR-BI ρυθμίζεται από οιστρογόνα, χοληστερόλη και λιπαρά οξέα της διατροφής. Η έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε στεροειδογενείς ιστούς των τρωκτικών ρυθμίζεται από αυξητικές ορμόνες. Στους ιστούς αυτούς ο υποδοχέας SR-BI διευκολύνει την δέσμευση της χοληστερόλης για αποθήκευση ή την σύνθεση στεροειδών ορμονών.

Ο υποδοχέας SR-BI επίσης αποτελεί υποδοχέα υψηλής συγγένειας και για την λιποπρωτεΐνη LDL (278), και συμμετέχει στην επιλεκτική δέσμευση των λιπιδίων της LDL (306, 307), με τρόπο εντελώς διαφορετικό από το καλά χαρακτηρισμένο μονοπάτι ενδοκύτωσης του κλασσικού υποδοχέα της LDL (308). Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να επιδράσει στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποB (299, 300, 302, 303, 305).

II) Κλωνοποίηση του υποδοχέα SR-BI

Σύντομα μετά την ταυτοποίηση του CD36, απομονώθηκε το cDNA για τον υποδοχέα SR-BI του χάμστερ (haSR-BI) με χρήση της μεθόδου κλωνοποίησης έκφρασης, από ένα μείγμα μεταλλαγμένων κυττάρων ωοθήκης κινέζικου χάμστερ (CHO), το οποίο εκφράζει ένα τύπο υποδοχέα καθαριστή (SR), που διαφέρει από τους υποδοχείς SR-AI και SR-AII. Ακολούθως κλωνοποιήθηκαν τα ομόλογα του haSR-BI από ποντίκι, αρουραίο, βόδι και άνθρωπο. Αρχικά ο ανθρώπινος υποδοχέας SR-BI είχε ταυτοποιηθεί ως cDNA άγνωστης λειτουργίας (που ονομάστηκε CLA-1) (309) και χαρτογραφήθηκε στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 12 (12q24.2-qter) (310), ενώ το γονίδιο του ποντικού χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 5 (311). Ο υποδοχέας SR-BI του ανθρώπου εμφανίζει ιστο-ειδική έκφραση και η δράση του μοιάζει με αυτές του υποδοχέα SR-BI των τρωκτικών. Έχουν δημοσιευθεί η μερική και η ολική δομή για τα ομόλογα γονίδια του υποδοχέα SR-BI του ποντικού και του ανθρώπου αντίστοιχα (304, 310). Το γονίδιο του υποδοχέα SR-BI του ανθρώπου αποτελείται περίπου από 78 kb και περιέχει 13 εξόνια και 12 ιντρόνια (310). Το πρώτο ιντρόνιο είναι εξαιρετικά μεγάλο (περίπου 48 kb), και τα εξόνια 2-12 καταλαμβάνουν μια περιοχή περίπου 30 kb (310). Η θέση έναρξης της μεταγραφής ταυτοποιήθηκε 140 βάσεις πριν από την θέση έναρξης της μετάφρασης και το mRNA έχει μέγεθος περίπου 2.8 kb. Ο υποδοχέας SR-BI εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, στους στεροειδογενείς ιστούς (επινεφρίδια, ωοθήκες, όρχεις), και σε μικρότερα ποσά στον μαστό/ γαλακτικούς αδένες (118).

III) Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου του υποδοχέα SR-BI

Οι ακριβείς μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI έχουν αρχίσει να διευκρινίζονται προσφάτως. Η περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του SR-BI περιέχει συντηρημένες αλληλουχίες για την αναγνώριση και σύνδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως τον στεροειδογενή παράγοντα 1 (steroidogenic factor) (SF-1) και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως C/EBP και SREBP (310, 312). Η μεταγραφική ρύθμιση από τους παραπάνω και πιθανώς άλλους μη ταυτοποιημένους παράγοντες πιθανώς να είναι υπεύθυνη για το μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI, από αυξητικές ορμόνες, χοληστερόλη και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Η ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI από αυξητικές ορμόνες σε στεροειδογενή κύτταρα πιθανώς εξαρτάται από ένα μονοπάτι μετάδοσης σήματος στο

οποίο συμμετέχει το κυκλικό AMP (cAMP) και η πρωτεϊνική κινάση Α, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως των C/EBP και SF-1 (313). Η θέση πρόσδεσης του SF-1 είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του SR-BI σε καλλιεργούμενα κύτταρα επινεφριδίων (310), καθώς και για την έκφραση του υποδοχέα SR-BI, κατά την ανάπτυξη των στεροειδογενών ιστών του ποντικού σε πειραματόζωα (314). Τέλος η θέση πρόσδεσης του SF-1 έχει δειχθεί ότι είναι σημαντική για την βασική και την ενεργοποιούμενη από cAMP μεταγραφή του γονιδίου του υποδοχέα SR-BI (312). Οι πρωτεΐνες C/EBP αποτελούν ενδοκυτταρικούς μεταβιβαστές των ρυθμιστικών ενεργοτήτων ποικίλων αυξητικών ορμονών (315) και μπορεί να συμμετέχουν στην ρύθμιση του υποδοχέα SR-BI από αυξητικές ορμόνες, ή με cAMP-εξαρτώμενο τρόπο. Αυτό μπορεί να έχει μεγάλη σημασία για την ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI από αυξητικές ορμόνες στους ιστούς που δεν εκφράζεται ο παράγοντας SF-1.

Η έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε στεροειδογενή κύτταρα σε κυτταρικές καλλιέργειες και σε πειραματόζωα είναι πιθανό να ρυθμίζεται και από την χοληστερόλη (314, 316). Έχουν ταυτοποιηθεί στην περιοχή 2.2 Kb πριν από την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου του υποδοχέα SR-BI δύο λειτουργικά ρυθμιστικά στοιχεία που αναγνωρίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1a που ρυθμίζεται από στερόλες (310, 312). Μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητα του SREBP-1a να επάγει την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς που συνδέεται στον υποκινητή του γονιδίου του SR-BI, εξαρτάται μερικώς από την παρουσία των ρυθμιστικών αυτών στοιχείων (312). Η έκφραση του SREBP-1a επάγεται από γοναδοτροπίνη, και προηγείται της αύξησης της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στις ωοθήκες. Επιπλέον προτάθηκε ότι η SREBP-1a-εξαρτώμενη ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI μπορεί να δρα συνεργειακά με την επαγώμενη έκφραση του γονιδίου από τον μεταγραφικό παράγοντα SF-1 (312). Κάποιες άλλες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε μακροφάγα μπορεί να ρυθμίζεται μέσω υποδοχέων PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) (317), και ότι η χοληστερόλη των οιστρογόνων και της διατροφής επάγει την ενεργοποίηση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε ηπατικά μακροφάγα, ενώ αναστέλλει την κυτταρική έκφραση σε παρεγχυματικά κύτταρα (318).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI γίνεται με πολύπλοκους συνδυασμούς μεταγραφικών παραγόντων σε διαφορετικούς ιστούς. Στο στάδιο αυτό είναι εξαιρετικής σημασίας η κατανόηση των λεπτομερών μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ρυθμίζεται η έκφραση του υποδοχέα SR-BI στο

ήπαρ, όπου ο υποδοχέας παίζει βασικό ρόλο στο τελευταίο στάδιο της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Πιστεύεται ότι η ταυτοποίηση ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων που μπορούν να τροποποιήσουν την έκφραση ή την ενεργότητα του υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του μεταβολισμού της HDL, μέσω του υποδοχέα SR-BI, την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης και τους μηχανισμούς που οδηγούν σε αθηρωμάτωση στους ανθρώπους.

IV) Η πρωτεΐνη SR-BI

Το 2.8 kb mRNA του SR-BI κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μεγέθους 509 αμινοξέων. Υπάρχει 75-80% ταύτιση μεταξύ των προβλεπόμενων δομών των πρωτεϊνών των υποδοχέων SR-BI από χάμστερ, ποντίκι, αρουραίο, βόδι και άνθρωπο. Οι υποδοχείς SR-BI είναι μέλη της υπεροικογένειας των CD36 πρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή περιέχει τις πρωτεΐνες των θηλαστικών CD36 και LIMPII (μια πρωτεΐνη των λυσοσωμάτων), δύο πρωτεΐνες της *Drosophila melanogaster*, (emp και croquemort (υποδοχέας αιμοκυττάρων/μακροφάγων της Drosophila), την πρωτεΐνη SnmP-1 (μια μεμβρανική πρωτεΐνη των νευρώνων του μεταξοσκώληκα), και μια πρωτεΐνη του *C.elegans*. Τα μέλη της υπεροικογένειας CD36 έχουν 30% ομολογία σε αλληλουχία, και έχει προταθεί ότι έχουν παρόμοιες τοπολογίες στην προβλεπόμενη τριτοταγή τους δομή και θέση στην πλασματική μεμβράνη (277, 278, 295, 319). Οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας μεγάλης εξωκυτταρικής θηλιάς (loop), που διαπερνά την πλασματική μεμβράνη σε δύο μεριές και οι διαμεμβρανικές περιοχές ακολουθούνται από μικρές κυτοπλασματικές αμινο- και καρβοξυ-τελικές περιοχές. Το προτεινόμενο μοντέλο για την τοπολογία του υποδοχέα SR-BI του ποντικού φαίνεται στην εικόνα 17. Η κυτοπλασματική τοπολογία της καρβοξυτελικής περιοχής του υποδοχέα SR-BI στο ποντίκι επιβεβαιώθηκε με χρησιμοποίηση αντισώματος που αναγνωρίζει την εν λόγω περιοχή (118, 320). Η τοπολογία της αμινοτελικής περιοχής (κυτοπλασματική ή εξωκυτταρική) παραμένει ακόμη υπό μελέτη (118). Οι υποδοχείς SR-BI και CD36 εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία τους, ιδιαίτερα σε όλες τις εξωκυτταρικές περιοχές της θηλιάς, συμπεριλαμβανομένων των συντηρημένων κυστεϊνών (πέντε ή έξι) και των πολλαπλών θέσεων γλυκοσυλίωσης. Όμως οι αμινο- και οι καρβοξυτελικές κυτοπλασματικές και οι διαμεμβρανικές περιοχές έχουν μικρή ομολογία στην αλληλουχία. Ο υποδοχέας SR-BI στο ποντίκι εμφανίζει γλυκοσυλίωση σε μεγάλο βαθμό, η οποία είναι υπεύθυνη για την διαφορά της μάζας μεταξύ της προβλεπόμενης

αμινοξικής αλληλουχίας (περίπου 57 KDa), και της μοριακής μάζας (περίπου 82 KDa) που παρατηρείται με ανοσο-χημικές μεθόδους (118, 320). Ο υποδοχέας SR-BI στο ποντίκι τροποποιείται κατά την διάρκεια της μετάφρασης σε τουλάχιστον 5 από τις 10 θέσεις γλυκοσυλίωσης (που δεσμεύουν μαννόζες σε N-θέσεις) (320). Επίσης παρουσιάζει ακυλίωση στα λιπαρά οξέα, όπως και ο CD36, και άλλες πρωτεΐνες που συγκεντρώνονται στις καβεόλες (caveolae), που αποτελούν ειδικευμένες μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης, πλούσιες σε χοληστερόλη και γλυκολιπίδια (296, 322). Οι κύριες θέσεις της ακυλίωσης είναι οι κυστεΐνες στις θέσεις 462 και 470, όπως έχει δειχθεί με ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων. Ο υποδοχέας SR-BI του ποντικού συνκατακριμνίζεται με την καβεολίνη-1, που είναι πρωτεΐνη των καβεολών, σε κηλιδωτές (punctate) μικροπεριοχές κατά μήκος της επιφάνειας των κυττάρων. Τα μοναδικά χαρακτηριστικά των καβεολών έχει προταθεί ότι μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην δράση του υποδοχέα SR-BI.

Επίσης έχει ταυτοποιηθεί ένα εναλλακτικό προιόν εκτομής των ιντρονίων του υποδοχέα SR-BI που καλείται SR-BII. Ο υποδοχέας SR-BII είναι μια ισομορφή του SR-BI, στην οποία τα 42 από τα 45 καρβοξυτελικά αμινοξέα στην καρβοξυτελική κυτοπλασματική περιοχή του υποδοχέα SR-BI έχουν αντικατασταθεί από 40 υπολλείμματα τα οποία κωδικοποιούνται από ένα ξεχωριστό εξόνιο (310, 323). Ο υποδοχέας SR-BII επίσης συγκεντρώνεται στις καβεόλες (324).

V) Λειτουργίες του υποδοχέα SR-BI

1) Ειδικότητα πρόσδεσης διαφόρων συνδετών

Ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να συνδεθεί με τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες, όπως οξειδωμένη LDL και μαλονυλο-αλβουμίνη ορού μόσχου (278). Εντούτοις οι ειδικότητες των υποδοχέων της τάξης Β διαφέρουν από αυτές των υποδοχέων των τάξεων Α και C. Ο υποδοχέας SR-BI, όπως και ο CD36, μπορούν να συνδεθούν ειδικά με ανιονικά φωσφολιπίδια (π.χ. φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφιατιδυλ-ινοσιτόλη) (292). Λόγω της ικανότητας αναγνώρισης της εκτεθειμένης φωσφατιδυλοσερίνης στην κυτταρική επιφάνεια οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να συνδέονται με αποπτωτικά κύτταρα, και πιθανώς να συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας των οργανισμών (290, 291).Μια ιδιότητα του υποδοχέα SR-BI η οποία δεν απαντάται στον CD36 είναι η ικανότητα του να συνδέεται με υψηλή συγγένεια και με την φυσική μορφή της λιποπρωτεΐνης LDL (278). Ο υποδοχέας SR-BI αποτελεί τον δεύτερο υποδοχέα της LDL, που έχει

χαρακτηρισθεί σε μοριακό επίπεδο, 20 χρόνια μετά από τον πρώτο κλασσικό υποδοχέα της LDL που έχει περιγραφεί από τους Brown και Goldstein (308). Εντούτοις ο υποδοχέας SR-BI είναι λιγότερο αποτελεσματικός στην ενδοκυττάρωση της φυσικής ή της τροποποιημένης LDL συγκριτικά με τον υποδοχέα της LDL (119, 278).

Η μεγαλύτερη όμως σημασία που έχει αποδωθεί στον υποδοχέα SR-BI προήλθε από έρευνες στο εργαστήριο του Δρα Monty Krieger. Συγκεκριμένα, στα πλαίσια της ανάλυσης της ενεργότητας των μορίων-συνδετών που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα SR-BI, με χρήση μετασχηματισμένων κυτταρικών καλλιεργειών που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI, ανακαλύφθηκε ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να προσδεθεί με την HDL (Kd περίπου 15-30 μg πρωτεΐνης/ml) με τρόπο που είναι ανεξάρτητος του EDTA και της αποΕ (118). Επίσης έγιναν μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε Alexa-HDL, στην οποία οι απολιποπρωτεΐνες στην επιφάνεια των σωματιδίων της HDL είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με την πράσινη-φθορίζουσα χρωστική που καλείται Alexa (325). Βρέθηκε ότι η σύνδεση της Alexa-HDL σε κύτταρα COS που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI του ποντικού γίνεται στην επιφάνεια των κυττάρων με κηλιδωτό (punctuate) πρότυπο. Η τοπολογία αυτή συναντάται σε υποδοχείς που είναι εντοπισμένοι σε καβεόλες (caveolae). Μελέτες με τις απολιποπρωτεΐνες αποA-I, αποA-II, και αποC-III, υπό μορφή σωματιδίων με φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, έδειξαν ότι καθεμιά από τις απολιποπρωτεΐνες της HDL μπορεί να συμβάλλει στην σύνδεση των δισκοειδών σωματιδίων στον υποδοχέα SR-BI (21).

Οι παρατηρήσεις αυτές και το γεγονός ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να συνδεθεί με λιποπρωτεΐνες που περιέχουν αποΒ καθιστούν πιθανό ότι ο υποδοχέας SR-BI είναι υπεύθυνος για την πρόσδεση ποικιλίας λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών σε διάφορα κύτταρα και ιστούς (121). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η HDL ανταγωνίζεται πολύ αποτελεσματικά την σύνδεση φυσικής LDL στον υποδοχέα SR-BI, ενώ η φυσική LDL ανταγωνίζεται σε πολύ μικρό βαθμό την σύνδεση της HDL (118). Λόγω αυτού του μη-αμοιβαίου εκατέρωθεν συναγωνισμού (nonreciprocal crosscompetition), η LDL αναμένεται να μην παρεμβάλλεται στην σύνδεση της HDL με τον υποδοχέα SR-BI στον οργανισμό.

2) Η σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI προάγει την επιλεκτική είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL στο κύτταρο

Ο υποδοχέας SR-BI συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στην HDL, εντούτοις δεν προκαλεί ενδοκυτάρωση και λυσοσωματική αποικοδόμηση του ακέραιου σωματιδίου της λιποπρωτεΐνης, όπως συμβαίνει με το μονοπάτι που ακολουθείται από τον υποδοχέα της LDL. Μελέτες σύνδεσης HDL, με ραδιοσημασμένα ή φθορίζοντα λιπίδια έδειξαν ότι ο υποδοχέας SR-BI επάγει την αποτελεσματική κυτταρική επιλεκτική πρόσληψη των λιπιδίων της HDL (118). Στο παρελθόν αρκετοί ερευνητές είχαν δείξει ότι η επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από κύτταρα και ιστούς δεν εξαρτάται από μια μοναδική τάξη λιποπρωτεΐνης ή απολιποπρωτεΐνης (13, 98, 121, 181, 326). Είναι λοιπόν πιθανό ότι ο υποδοχέας SR-BI, ο οποίος είναι υποδοχέας πολλών λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών να είναι υπεύθυνος για τις προηγούμενες παρατηρήσεις. Παράλληλα είναι πιθανό να υπάρχουν περισσότεροι από ένας υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και να έχουν ξεχωριστές δομές, ιστοειδικές κατανομές και λειτουργίες.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο υποδοχέας SR-BI προάγει την επιλεκτική πρόσληψη των λιπιδίων από την HDL από τα κύτταρα δεν είναι ακόμη γνωστός και έχουν προταθεί διάφορα πιθανά μοντέλα (325, 327). Αρχικά είχε προταθεί το μοντέλο ‘της προσκόλλησης’ (docking), σύμφωνα με το οποίο η επιλεκτική είσοδος των εστέρων χοληστερόλης απαιτεί να έρθει η HDL σε κοντινή απόσταση με την πλασματική μεμβράνη. Σε αυτό το μοντέλο η μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης επιτυγχάνεται χωρίς την μηχανική παρέμβαση του υποδοχέα (328). Εναλλακτικά έχει προταθεί ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί άμεσα και ειδικά να διευκολύνει την μεταφορά των λιπιδίων, σαν επακόλουθο της σύνδεσης της HDL στα κύτταρα. Το ερώτημα αυτό επιλύθηκε με μελέτη σύγκρισης των κυττάρων που εκφράζουν είτε τον CD36 είτε τον υποδοχέα SR-BI. Όπως έχει αναφερθεί ο ανθρώπινος CD36 έχει παρόμοια αλληλουχία και κυτταρική τοπολογία με τον υποδοχέα SR-BI. Ο CD36 μπορεί να συνδεθεί με την HDL με μεγάλη συγγένεια (325), αλλά δεν είναι ικανός να καταλύσει αποτελεσματικά την είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL στο κύτταρο (329). Η ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων και χιμαιρικών μορφών του υποδοχέα SR-BI του ποντικού/ CD36 του ανθρώπου έδειξε ότι η μοναδική ικανότητα του υποδοχέα SR-BI να προάγει την επιλεκτική είσοδο εστέρων χοληστερόλης στο κύτταρο διαμεσολαβείται κυρίως μέσω της εξωκυτταρικής του περιοχής (θηλιάς), και δεν εξαρτάται από τον βαθμό ακυλίωσης των λιπαρών οξέων ή από ειδικές αλληλουχίες στις δύο περιοχές των διαμεμβρανικών και των κυτοπλασματικών του αλληλουχιών. Επίσης βρέθηκε ότι ο υποδοχέας SR-BII, που

είναι μια ισομορφή του υποδοχέα SR-BI (με διαφορετική καρβοξυτελική κυτοπλασματική περιοχή), προάγει την επιλεκτική είσοδο εστέρων χοληστερόλης στο κύτταρο σε ποσοστό 25% εν σχέσει με τον υποδοχέα SR-BI (324). Οι παρατηρήσεις αυτές φανερώνουν ότι η κυτοπλασματική καρβοξυτελική περιοχή του υποδοχέα SR-BI επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του για την επιλεκτική είσοδο εστέρων χοληστερόλης στο κύτταρο.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι η σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI και η επακόλουθη διευκόλυνση της μεταφοράς των εστέρων χοληστερόλης του σωματιδίου της HDL, αποτελεί τον πιο πιθανό μηχανισμό για την επιλεκτική μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης από την HDL στο κύτταρο, που έχει παρατηρηθεί μέχρι σήμερα σε κύτταρα και πειραματόζωα. Έχει προταθεί ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να σχηματίζει ένα υδροφοβικό κανάλι, μέσω του οποίου η χοληστερόλη κινείται μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και της HDL, με βάση την διαβάθμιση της συγκέντρωσής της (330). Εναλλακτικά ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να ενώνεται με ειδικό τρόπο με ένα ή περισσότερα συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας που επιδρούν άμεσα και καθιστούν δυνατή την μεταφορά της χοληστερόλης.

Στην παρούσα φάση παραμένει το ερώτημα κατά πόσο η ειδική τοπολογία του υποδοχέα SR-BI σε καβεόλες (caveolae) ή κανάλια (microvillar) επηρεάζει την επιλεκτική μεταφορά των λιπιδίων. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι εστέρες της χοληστερόλης της HDL που προσλαμβάνονται μέσω του υποδοχέα SR-BI, ενσωματώνονται γρήγορα και με αντιστρεπτό τρόπο στις καβεόλες της πλασματικής μεμβράνης, και ακολουθεί εσωτερίκευση της χοληστερόλης στα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (331). Επίσης η ταυτόχρονη έκφραση του υποδοχέα SR-BI με την καβεολίνη-1 έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με αυξημένη επιλεκτική δέσμευση εστέρων χοληστερόλης της HDL από μακροφάγα (332).

3) Ο ρόλος του υποδοχέα SR-BI στην έξοδο της χοληστερόλης από το κύτταρο

Έχει παρατηρηθεί ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να συμμετέχει στην έξοδο της χοληστερόλης από κύτταρα, που προάγεται από την HDL, καθώς και στην κυτταρική πρόσληψη της ελεύθερης χοληστερόλης (193, 333). Τα υπάρχοντα δεδομένα για την δράση του υποδοχέα SR-BI συνοψίζονται στη συνέχεια.

Ο υποδοχέας SR-BI συγκεντρώνεται σε καβεόλες (caveolae) οι οποίες πιθανολογείται ότι αποτελούν τις θέσεις της εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα

(334). Η μελέτη διαφορετικών κυτταρικών σειρών έδειξε ότι τα επίπεδα της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σχετίζονται με τους ρυθμούς της εξόδου της ελεύθερης χοληστερόλης από τα κύτταρα στην HDL (191). Η πιο άμεση ένδειξη για τον ρόλο του υποδοχέα SR-BI στην επαγωγή της εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα προέρχεται από μελέτες στις οποίες μετασχηματισμένες κυτταρικές καλλιέργειες που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI εμφανίζουν αυξημένη έξοδο της ελεύθερης χοληστερόλης στην HDL (335). Επίσης παρατηρήσεις σε ποντίκια που υπερεκφράζουν τον SR-BI, συμφωνούν ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να παίζει ρόλο στην έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα (119, 121, 299). Πιστεύεται ότι η διευκόλυνση της εξόδου της κυτταρικής χοληστερόλης δεν οφείλεται στην σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI, αλλά σε αλλαγές στην κατανομή της χοληστερόλης της πλασματικής μεμβράνης που εξαρτώνται από τον υποδοχέα SR-BI (336). Συγκεκριμένα ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να διευκολύνει την ροή της χοληστερόλης μεταξύ των σωματιδίων της HDL και της κυτταρικής πλασματικής μεμβράνης και προς τις δύο κατευθύνσεις, ανάλογα με την διαβάθμιση της χοληστερόλης. Η φυσιολογική σημασία της εξόδου της χοληστερόλης που προάγεται από τον υποδοχέα SR-BI δεν έχει καθιερωθεί ακόμη, αλλά είναι πιθανό να παίζει ρόλο στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης και στην αθηρογένεση.

4) Ο υποδοχέας SR-BI ως υποδοχέας της HDL-Ρόλος του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό της HDL

Ο υποδοχέας SR-BI αποτελεί τον πρώτο φυσιολογικά σημαντικό υποδοχέα της HDL, ο οποίος προάγει την κυτταρική επιλεκτική είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL στα κύτταρα-στόχους και ως εκ τούτου παίζει βασικό ρόλο στον μεταβολισμό της HDL, και την διαδικασία της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Τα δεδομένα που συνηγορούν στο συμπέρασμα αυτό μπορούν να συνοψισθούν στα εξής: I) η κατανομή του υποδοχέα SR-BI σε ιστούς πειραματοζώων, II) η ορμονική ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε κύτταρα και ζωντανούς οργανισμούς, III) η τροποποίηση της έκφρασης του SR-BI με ανοσοχημικές (αναστολή της δράσης του υποδοχέα SR-BI με αντισώματα), ή γενετικές τεχνικές (ηπατική υπερέκφραση ή απενεργοποίηση του γονιδίου του SR-BI σε ποντίκια).

I) Κατανομή της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε ιστούς πειραματοζώων

Οι πρώτες μελέτες της κατανομής της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε ιστούς πειραματοζώων έγιναν με ανοσο-αποτύπωση σε δείγματα ιστών ποντικού και αρουραίου**.**

Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλες μελέτες, οι οποίες συμφωνούν ότι ο υποδοχέας SR-BI εκφράζεται κυρίως στους ιστούς που έχει δειχθεί προηγουμένως ότι αποτελούν τους κύριους ιστούς της επιλεκτικής πρόσληψης των εστέρων χοληστερόλης της HDL σε πειραματόζωα, όπως το ήπαρ, τα επινεφρίδια, και την ωοθήκη (118, 122). Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα SR-BI παρατηρούνται σε μη-διηγερμένους όρχεις και το έντερο ενώ σημαντικά επίπεδα ανιχνεύονται σε γαλακτοποιούς αδένες των εγκύων ποντικών (122). Η μελέτη ιστών λιποκυττάρων ποντικού και ενεργοποιημένων προ-λιποκυττάρων σε κυτταρικές καλλιέργειες έδειξε την σύνθεση υψηλών επιπέδων mRNA του υποδοχέα SR-BI, αλλά πολύ χαμηλών ποσοτήτων της αντίστοιχης πρωτεΐνης (118, 122). Έτσι συμπεραίνεται ότι η μέτρηση των απολύτων ποσοτήτων και των αλλαγών στα επίπεδα του mRNA του υποδοχέα SR-BI δεν αντανακλά πάντοτε τα επίπεδα του ποσού και την ενεργότητα της πρωτεΐνης στους ιστούς ή στα κύτταρα (121).

Επιπλέον, κατά την εμβρυογένεση στο ποντίκι υπάρχει χρονικό και τοπολογικό πρότυπο στην έκφραση του υποδοχέα SR-BI. Συγκεκριμένα ο υποδοχέας SR-BI εκφράζεται κυρίως στον πλακούντα και στον εμβρυϊκό σάκο, στα στάδια εκείνα της ανάπτυξης που απαιτείται η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών από την μητέρα στο έμβρυο. Πιστεύεται ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να συμμετέχει στο σύστημα μεταφοράς λιπιδίων από την μητέρα στο έμβρυο στα τρωκτικά, με το να δεσμεύει την χοληστερόλη της HDL που θα χρησιμοποποιηθεί είτε για σύνθεση μεμβρανών είτε για σύνθεση στεροειδών ορμονών είτε και για τις δύο διαδικασίες (337).

II) Ορμονική ρύθμιση της έκφρασης του SR-BI σε κυτταρικές καλλιέργειες και πειραματόζωα

Η υπόθεση ότι ο υποδοχέας SR-BI συμμετέχει στην επιλεκτική μεταφορά της χοληστερόλης της HDL σε ζωντανούς οργανισμούς (118) βασίζεται και στην αποδοχή ότι η επίδραση φυσιολογικών και φαρμακολογικών ερεθισμάτων που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των στερολών στους ιστούς που εκφράζεται ο υποδοχέας SR-BI, θα έχει προφανή επίδραση στα επίπεδα της πρωτεΐνης στους συγκεκριμένους ιστούς. Η ρύθμιση της έκφρασης του SR-BI σε κύτταρα και πειραματόζωα έχει μελετηθεί σε ήπαρ, καθώς και σε επινεφρίδια, ωοθήκες και όρχεις, όπου η έκφραση του υποδοχέα SR-BI ρυθμίζεται με συντονισμένο τρόπο με την στεροειδογένεση. Στους στεροειδογενείς αυτούς ιστούς πιστεύεται ότι η επιλεκτική μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης της HDL μέσω του υποδοχέα SR-BI αποτελεί την βασική πηγή χοληστερόλης που θα χρησιμοποιηθεί για αποθήκευση και για την σύνθεση στεροειδών ορμονών.

Παρακάτω συνοψίζονται οι μελέτες για την ρύθμιση της έκφρασης του SR-BI στα βασικά όργανα στεροειδογένεσης, όπως επινεφρίδια, ωοθήκες και όρχεις και στο ήπαρ.

α) Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε επινεφρίδια

Στα επινεφρίδια του ποντικού ο υποδοχέας SR-BI εκφράζεται στις επιφάνειες των παρεγχυματικών κυττάρων του φλοιού των επινεφριδίων. Η έκφραση του υποδοχέα SR-BI στα επινεφρίδια ρυθμίζεται εις απάντηση αυξητικών ορμονών, όπως αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH-adrenocotricotrophic hormone), οι οποίες όπως είναι γνωστό ρυθμίζουν την δέσμευση της χοληστερόλης της HDL και την σύνθεση των στεροειδών ορμονών (314, 316, 338). Οι Rigotti et al (338) έδειξαν ότι η χορήγηση ACTH σε ποντίκια αυξάνει δραματικά την έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα SR-BI σε κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων σε πειραματόζωα. Φαίνεται πιθανό ότι η ορμόνη δρά με άμεσο τρόπο στα κύτταρα, παρά έμμεσο, γιατί επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα mSR-BI. Επίσης η ορμόνη επάγει την έκφραση του mRNA (125, 339) σε καλλιέργειες κυττάρων επινεφριδίου του ποντικού ή του ανθρώπου. Επίσης η χορήγηση του γλυκοκορτικοειδούς δεξαμεθαζόνη σε ποντίκια, η οποία αναστέλλει την έκκριση του ACTH και άρα την στεροειδογένεση, αναστέλλει δραματικά και την έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα SR-BI σε κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων. Αυτό υποδηλώνει ότι τα σχετικά αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα SR-BI στον ιστό αυτό μπορεί να προκαλούνται από την ενδογενή παραγωγή ACTH. Η έκφραση του υποδοχέα SR-BI και η ρύθμιση από ACTH και cAMP σε κύτταρα επινεφριδίου ανθρώπου είναι παρόμοια με αυτή του ποντικού (339, 340, 341) και πιστεύεται ότι ο υποδοχέας SR-BI στον άνθρωπο μπορεί να προμηθεύσει εστέρες χοληστερόλης της HDL για την στεροειδογένεση σε κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων (341).

Η χορήγηση οιστρογόνων σε ποντίκια δεν φαίνεται να προκαλεί εμφανείς επιδράσεις στα επίπεδα της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στο επινεφρίδιο και στους άλλους ιστούς στεροειδογένεσης. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση οιστρογόνων μπορεί να εξαρτάται από το είδος του ζώου, και τα οιστρογόνα μπορούν να επηρεάζουν την έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε μεγάλο αριθμό οργάνων σε ορισμένα θηλαστικά. Για παράδειγμα τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος σε αρουραίους, κουνέλια και ανθρώπους είναι ευαίσθητα σε οιστρογόνα, κάτι που δεν παρατηρείται στα ποντίκια. Σε αρουραίους έχει δειχθεί ότι υψηλή δόση οιστρογόνων αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα SR-BI στις επιφάνειες των κυττάρων του φλοιού των επινεφριδίων και η αύξηση αυτή συνοδεύεται από αύξηση της σύνδεσης της αποA-I στις

ίδιες θέσεις και την επιλεκτική πρόσληψη της HDL (122). Πιστεύεται ότι στους αρουραίους ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να συμμετέχει και στον μεταβολισμό της LDL στα επινεφρίδια, μετά από χορήγηση οιστρογόνων.

Η σημασία του υποδοχέα SR-BI στην αποθήκευση της χοληστερόλης στα επινεφρίδια του ποντικού αποκαλύπτεται από την έλλειψη αποθηκών της χοληστερόλης σε αυτό τον αδένα σε διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI (304). Επίσης η παρεμπόδιση της δράσης του υποδοχέα SR-BI, με χρήση αντισωμάτων, αναστέλλει την επιλεκτική είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL και την χρήση της για την σύνθεση των στεροειδών ορμονών σε καλλιέργειες κυττάρων του φλοιού των επινεφριδίων (342). Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα φανερώνουν τον σημαντικό ρόλο του υποδοχέα SR-BI στην μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης της HDL στα κύτταρα των επινεφριδίων.

β) Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε ωοθήκες

Η κατανομή και η ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε ωοθήκες έχει μελετηθεί σε καλλιέργειες κυττάρων και σε πειραματόζωα (122, 313, 343, 344, 345). Στην ωοθήκη πριν την ωορυξία το mRNA και η πρωτεΐνη του υποδοχέα SR-BI απαντώνται στα κύτταρα της θήκης (thecal) και τα διάμεσα (interstitial) κύτταρα. Η επίδραση της γοναδοτροπίνης ενεργοποιεί την παραγωγή ανδρογόνων (τεστοστερόνης) και την ταυτόχρονη έκφραση του υποδοχέα SR-BI στα διαφοροποιημένα κοκκοειδή κύτταρα (granulosa). Μετά την ωορυξία τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται σε κύτταρα του corpus luteum, τα οποία παράγουν στεροειδείς ορμόνες (προγεστερόνη). Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν αυξημένα ποσά του υποδοχέα SR-BI, και η έκφραση αυτή σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα προγεστερόνης του ορού σε πειραματόζωα. Ανάλυση κυττάρων ωοθήκης σε καλλιέργειες κυττάρων και πειραματόζωα φανερώνει ότι η έκφραση του υποδοχέα SR-BI γίνεται στην κυτταρική επιφάνεια σε κανάλια μικρολαχνών (microvillar channels), τα οποία συνδέονται στην HDL και εμφανίζουν επιλεκτική πρόσληψη φθοριζόντων εστέρων χοληστερόλης της HDL (344, 345).

Η χοληστερόλη φαίνεται να έχει μικρότερη επίδραση στην ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στην ωοθήκη. Η φόρτωση κυττάρων με περίσσεια χοληστερόλης δεν επηρεάζει τα επίπεδα του SR-BI στα διαφοροποιημένα κοκκοειδή κύτταρα (granulosa) (345), ενώ η έλλειψη της χοληστερόλης επάγει λιγότερο την έκφραση του υποδοχέα SR-BI (344).

Η σημασία του υποδοχέα SR-BI στην φυσιολογία της αναπαραγωγής δείχθηκε από το γεγονός ότι τα θηλυκά διαγονιδικά ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το

γονίδιο του υποδοχέα SR-BI είναι στείρα (305). Η ιστολογική ανάλυση των ωοθηκών δείχνει μειωμένα επίπεδα αποθηκών χοληστερόλης σε corpea lutea ζώων όπου έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο του υποδοχέα SR-BI (SR-BI -/-) συγκριτικά με τα κανονικά ποντίκια. Παρά την μειωμένη αποθήκευση λιπιδίων στην ωοθήκη ο κύκλος των θηλυκών SR-BI -/- ποντικών κατά την περίοδο του οίστρου (estrus), παράγει κανονικό αριθμό ωοκυττάρων στην ωορυξία. Επίσης τα ποντίκια έχουν κανονικά επίπεδα προγεστερόνης στο πλάσμα, μετά από το ζευγάρωμα με στείρα αρσενικά. Η στειρότητα των θηλυκών ποντικών σχετίζεται με μειωμένη βιωσιμότητα και αναπτυξιακό δυναμικό των ωοκυττάρων και ετερόζυγων εμβρύων πριν από την εμφύτευση (preimplantation) που προκύπτουν από αυτά. Επιπλέον μελέτες απαιτούνται για να καθοριστούν οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους η έλλειψη του υποδοχέα SR-BI επιδρά στην γονιμότητα των θηλυκών σε ποντίκια.

γ) Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε όρχεις

Στους όρχεις ο υποδοχέας SR-BI εκφράζεται κυρίως στα στεροειδογενή κύτταρα Leydig και σε μικρότερα ποσά στα κύτταρα Sertoli. Η έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε κύτταρα Leydig επάγεται σε μεγάλο βαθμό μετά από χορήγηση γοναδοτροπίνης (hCG) σε πειραματόζωα, η οποία αυξάνει την είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL και την σύνθεση τεστοστερόνης σε κύτταρα (122). Επίσης δείχθηκε ότι η χορήγηση σε κύτταρα Sertoli (346) αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα SR-BI μπορεί να αναστείλλει μερικώς την σύνδεση αποπτωτικών σπερματογενικών κυττάρων in vitro. Η σημασία του υποδοχέα SR-BI στην αποθήκευση των λιπιδίων και την στεροειδογένεση σε κύτταρα Leydig και ο ρόλος του υποδοχέα SR-BI σε κύτταρα Sertoli σε ζωντανούς οργανισμούς δεν είναι πλήρως καθορισμένη. Εντούτοις το γεγονός ότι τα αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI είναι γόνιμα φανερώνει ότι ο υποδοχέας SR-BI δεν είναι απαραίτητος για την γονιμότητα σε αρσενικά ποντίκια (304, 305).

δ) Ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ

Παρά το γεγονός ότι η έκφραση του υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ δεν είναι τόσο μεγάλη όσο στους στεροειδογενείς ιστούς, το μεγάλο μέγεθος του ήπατος το καθιστά ως τον κύριο ιστό έκφρασης του υποδοχέα SR-BI, καθώς και της επιλεκτικής εισόδου εστέρων χοληστερόλης της HDL στα κύτταρα (118, 119, 122, 304, 305). Υπό κανονικές συνθήκες ο υποδοχέας SR-BI εκφράζεται κυρίως σε ηπατοκύτταρα και η έκφραση του μπορεί να ρυθμίζεται από ορμόνες και την διατροφή (χοληστερόλη και λιπαρά οξέα).

Σε αρουραίους βρέθηκε ότι η χορήγηση οιστρογόνων σε φαρμακολογικό επίπεδο και η διατροφή με χοληστερόλη αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα SR-BI και την επιλεκτική είσοδο εστέρων χοληστερόλης σε παρεγχυματικά κύτταρα και ταυτόχρονα επάγει την έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε κύτταρα Kuppfer (122, 318). Επομένως η χοληστερόλη της διατροφής μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ρύθμιση της ηπατικής έκφρασης του υποδοχέα SR-BI σε πειραματόζωα. Αντίθετα μια άλλη μελέτη στο χάμστερ έδειξε ότι τα επίπεδα του υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ και η μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης της HDL δεν ρυθμίζονται από αλλαγές στην περιεκτικότητα της χοληστερόλης των ηπατικών κυττάρων η οποία επηρεάζεται από την χοληστερόλη της διατροφής (347). Επιπλέον η έλλειψη της HDL του πλάσματος σε ποντίκια που δεν εκφράζουν αποA-I δεν αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ, υποδηλώνοντας ότι τα ηπατικά επίπεδα του υποδοχέα SR-BI δεν είναι υπό επανατροφοδοτικό (feedback) έλεγχο από την συγκέντρωση της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος (348). Προσφάτως δείχθηκε ότι πολυακόρεστα φυτικά λιπαρά οξέα της διατροφής μπορούν να διεγείρουν την ηπατική έκφραση του υποδοχέα SR-BI και την είσοδο των εστέρων της χοληστερόλης της HDL στο ήπαρ σε χάμστερ (349).

Συνοψίζοντας όλα τα δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε κύτταρα και σε πειραματόζωα μπορεί να υφίσταται ορμονική ρύθμιση. Με αυτό τον τρόπο αυξητικές ορμόνες, όπως ACTH και hCG, μπορούν άμεσα να ενεργοποιήσουν την έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του υποδοχέα SR-BI σε καλλιεργούμενα κύτταρα και/ή ιστούς πειραματοζώων. Επίσης η χορήγηση οιστρογόνων μπορεί να επάγει ή να αναστείλλει την έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε πειραματόζωα, με τρόπο που είναι εξαρτώμενος από το είδος του πειραματόζωου. Η παρατήρηση ότι σε μερικές περιπτώσεις οι ορμόνες και η διατροφή μπορούν να επάγουν την έκφραση του υποδοχέα SR-BI σε μερικούς ιστούς ή τύπους κυττάρων και να την αναστείλλουν σε άλλους δείχνει καθαρά ότι υπάρχουν κυτταρο-εξαρτώμενες διαφορές στα συστήματα που ρυθμίζουν την έκφραση του υποδοχέα SR-BI. Υπάρχει κάποια υποψία ότι η έκφραση του υποδοχέα SR-BI μπορεί να είναι ευαίσθητη στην κυτταρική σύσταση σε χοληστερόλη και οι πιο πειστικές μελέτες προέρχονται από μελέτες διατροφής με χοληστερόλη (318). Είναι πιθανό ότι σε μερικούς τύπους κυττάρων ή ιστών υπάρχει είτε ορμονική ρύθμιση που δεν εξαρτάται από την χοληστερόλη, είτε ρύθμιση που εξαρτάται από χοληστερόλη που είναι ανεξάρτητη από ορμόνες. Τέλος μπορεί να υπάρχει ρύθμιση από ταυτόχρονη σηματοδότηση με ορμόνες και χοληστερόλη.

III) Επίδραση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών HDL σε κύτταρα και πειραματόζωα

Η σημασία του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό της HDL υποστηρίζεται από πολλές μελέτες σε κύτταρα και πειραματόζωα. Οι Temel et al (342) ήταν οι πρώτοι που έδειξαν άμεσα ότι ο υποδοχέας SR-BI συμμετέχει στην επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων χοληστερόλης σε ένα φυσιολογικό σύστημα. Συγκεκριμένα η χρήση αντισωμάτων για ένα τμήμα της εξωκυτταρικής περιοχής του SR-BI του ποντικού ήταν ικανή να αναστείλλει την σύνδεση της HDL με τον υποδοχέα SR-BI και να αναστείλλει την επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων χοληστερόλης της HDL, και την μετατροπή σε στεροειδείς ορμόνες από κύτταρα του επινεφριδίου μετά από ενεργοποίηση με ACTH. Ακολούθησαν μελέτες στις οποίες τα επίπεδα της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI τροποποιήθηκαν σε πειραματόζωα, είτε με υπερέκφραση του γονιδίου στο ήπαρ (299-303), είτε με απενεργοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα SR-BI (304, 305, 350).

Οι πρώτες προσπάθειες μεταβολής των επιπέδων του υποδοχέα SR-BI σε πειραματόζωα έγιναν από τους Kozarsky et al (299), οι οποίοι υπερέκφρασαν τον υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ με χρήση ανασυνδυασμένου αδενοϊού. Η υπερέκφραση οδήγησε σε σχεδόν ολική απομάκρυνση της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος και διπλασιασμό της χοληστερόλης της χολής, 3 μέρες μετά την μόλυνση. Με την πάροδο του χρόνου μετά από την επιμόλυνση με τον αδενοϊό τα επίπεδα της ηπατικής έκφρασης του υποδοχέα SR-BI μειώθηκαν σταδιακά και τα επίπεδα της HDL επανήλθαν στις φυσιολογικές τιμές. Παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη μεταφορά φθορίζουσας χρωστικής λιπιδίων από την HDL στην χολή στα ποντίκια που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI. Οι παρατηρήσεις αυτές έδειξαν ότι ένα σημαντικό ποσό από την αυξημένη χοληστερόλη της χολής προέρχεται από την HDL του πλάσματος. Στα ίδια ποντίκια τα επίπεδα της αποA-I του πλάσματος μειώθηκαν, πιθανώς λόγω αυξημένης πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης της HDL με αποτέλεσμα την αυξημένη απομάκρυνση των απολιποπρωτεϊνών της HDL, πιθανώς μέσω του νεφρού, λόγω αναγνώρισης από την κουβιλίνη. Η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI ειδικά στο ήπαρ έχει επιτευχθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (301, 302, 303). Όλες οι μελέτες συμφωνούν ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα SR-BI στο ήπαρ προκαλεί μείωση της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος, αυξημένη επιλεκτική είσοδο των εστέρων χοληστερόλης της HDL στο ήπαρ, αυξημένη μεταφορά των λιπιδίων της HDL στην χολή, αύξηση της χοληστερόλης της χολής, και μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης σε μη-HDL λιποπρωτεΐνες, όπως IDL/LDL. Τα προαναφερθέντα

χαρακτηριστικά συμφωνούν με την υπόθεση ότι ο υποδοχέας SR-BI είναι φυσιολογικός υποδοχέας της HDL στο ήπαρ, που προάγει την επιλεκτική πρόσληψη των λιπιδίων της HDL.

Η άμεση καθοριστική απόδειξη για τον φυσιολογικό ρόλο του SR-BI στον μεταβολισμό της HDL προήλθε από την ανάλυση των ποντικών που φέρουν μια μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα SR-BI που εμποδίζει την παραγωγή πρωτεΐνης SR-BI (304). Τα ετερόζυγα και τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια εκφράζουν 50% ή καθόλου πρωτεΐνης υποδοχέα SR-BI αντίστοιχα. Τα πειραματόζωα έχουν κανονική βιωσιμότητα και κανονική εμφάνιση (βάρος, γενική εμφάνιση, συμπεριφορά). Τα αρσενικά είναι γόνιμα ενώ τα θηλυκά είναι στείρα, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Επίσης παρατηρείται μείωση στους ομόζυγους απογόνους που δεν ακολουθεί πρότυπο κληρονομικότητας κατά Μέντελ, και πιθανώς οφείλεται σε μειωμένη επιβίωση των νεογέννητων ή σε αλλαγές στην ανάπτυξη των εμβρύων. Η εξήγηση αυτή συμφωνεί με την προαναφερθείσα δράση του υποδοχέα SR-BI στις επιφάνειες των κυττάρων του πλακούντα και του εμβρυϊκού σάκου που έχει σκοπό την μεταβίβαση θρεπτικών συστατικών από την μητέρα στο έμβρυο. Σε σχέση με τα κανονικά ποντίκια, τα ετερόζυγα και ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια για τον υποδοχέα SR-BI έχουν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος (304). Η HDL στα ετερόζυγα είναι λίγο μεγαλύτερη από αυτή των κανονικών ποντικών. Στα ομόζυγα όμως η HDL είναι πολύ μεγαλύτερη, πιο ετερογενής και περιέχει πολύ περισσότερη αποE. Δεν υπάρχει αλλαγή στα επίπεδα της αποA-I του πλάσματος, πράγμα που συμφωνεί με την δράση του υποδοχέα SR-BI ως υποδοχέα επιλεκτικής πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης. Η μείωση της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος στα ομόζυγα ποντίκια συνοδεύεται από μείωση στην χοληστερόλη της χολής.

Επίσης δημιουργήθηκαν ποντίκια τα οποία εκφράζουν μειωμένα επίπεδα του υποδοχέα SR-BI (περίπου 50% των φυσιολογικών επιπέδων του ήπατος), λόγω μιας ένθεσης στην περιοχή του υποκινητή περίπου 2 Kb πριν από το πρώτο εξόνιο του SR-BI (350). Τα ομόζυγα αυτά ποντίκια (παρόμοια με τα ετερόζυγα ποντίκια της προηγούμενης μελέτης που δεν εκφράζουν καθόλου τον υποδοχέα SR-BI (304) χαρακτηρίζονται από μέτρια αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων της HDL καθώς και χοληστερόλης της HDL στο πλάσμα. Επίσης τα μειωμένα επίπεδα του υποδοχέα SR-BI σε ομόζυγα αυτά ποντίκια χαρακτηρίζονται από εμφανή μείωση στην απομάκρυνση των εστέρων χοληστερόλης της HDL του πλάσματος και την επιλεκτική δέσμευση των εστέρων χοληστερόλης της HDL στο ήπαρ, σε σχέση με τα κανονικά ποντίκια (350, 351). Τα

δεδομένα αυτά συνηγορούν με την υπόθεση ότι το αυξημένο μέγεθος και η σύσταση σε χοληστερόλη της HDL, απουσία υποδοχέα SR-BI, στα ποντίκια, οφείλεται σε μεταβολές στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης.

Εκτός από την επίδραση στα επίπεδα της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος, η γενετική προκλειθείσα μείωση της έκφρασης του υποδοχέα SR-BI επιδρά και στον μεταβολισμό της χοληστερόλης σε στεροειδογενείς ιστούς, με αποτέλεσμα να υπάρχει μείωση στα επίπεδα της χοληστερόλης σε επινεφρίδια και ωοθήκες, η οποία εξαρτάται από την δοσολογία του γονιδίου του υποδοχέα SR-BI (gene-dose dependent) (304, 305).

Οι παραπάνω μελέτες υποστηρίζουν ότι ο υποδοχέας SR-BI αποτελεί φυσιολογικό υποδοχέα της HDL, ο οποίος προάγει την επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων χοληστερόλης της HDL, και παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της HDL, στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης και την συνολική ομοιόσταση της χοληστερόλης του σώματος στα ποντίκια. Η ηπατική έκφραση του υποδοχέα SR-BI καθορίζει τα επίπεδα της χοληστερόλης της HDL του πλάσματος και την έκκριση της χοληστερόλης της χολής, ενώ η έκφραση του υποδοχέα SR-BI στους στεροειδογενείς ιστούς των τρωκτικών διευκολύνει την δέσμευση της χοληστερόλης με σκοπό την αποθήκευση ή την σύνθεση στεροειδών ορμονών.

5) Επίδραση του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών LDL

Όπως έχει αναφερθεί αρχικές μελέτες σε κύτταρα έδειξαν ότι ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να συνδεθεί και με μη-HDL λιποπρωτεΐνες, όπως την LDL (278, 352), και να επάγει την επιλεκτική μεταφορά εστέρων χοληστερόλης της LDL (306, 307). Μέσω αυτής της δράσης ο υποδοχέας SR-BI μπορεί να συμμετέχει στον μεταβολισμό των μη-HDL λιποπρωτεϊνών. Αποδείξεις του ρόλου του υποδοχέα SR-BI στην επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από τα κύτταρα προέρχονται από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία τροποποιήθηκε η έκφραση του SR-BI, και μελετήθηκαν τα επίπεδα και μερικές φορές οι ρυθμοί καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL, VLDL, IDL). Τα ομόζυγα και ετερόζυγα ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα της LDL, ή κανονικά ποντίκια που τρέφονται με δίαιτα πλούσια σε κεκορεσμένα λιπαρά και χοληστερόλη έχουν στο πλάσμα τους αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποΒ. Η ηπατική έκφραση του υποδοχέα SR-BI οδηγεί στην μείωση της χοληστερόλης των VLDL και IDL/LDL του πλάσματος, σε σχέση με κανονικά ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI (300, 302, 303, 353).

Επιπλέον τα επίπεδα της χοληστερόλης των VLDL λιποπρωτεϊνών σε διπλά διαγονιδιακά ποντίκια (SRBI -/- x αποΕ-/-) αυξάνονται σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες (αποΕ-/-) που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI (305). Ο ρόλος του υποδοχέα SR-BI στον μεταβολισμό των μη-HDL λιποπρωτεϊνών υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι ακόμη γνωστός, αλλά από τις υπάρχουσες μελέτες αναμένεται ότι ο υποδοχέας SR-BI σε οργανισμούς μπορεί να δράσει και ως υποδοχέας των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποΒ.

6) Ρόλος του υποδοχέα SR-BI στην αθηρωμάτωση

Ο υποδοχέας SR-BI λόγω της σημαντικής δράσης του στην ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών και στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από την HDL, είναι αναμενόμενο να θεωρείται ότι μπορεί να δράσει προστατευτικά ενάντια στην δημουργία αθηρωμάτωσης. Χρησιμοποιήθηκαν κυρίως διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία υπερεκφράστηκε ή απενεργοποιήθηκε το γονίδιο του υποδοχέα SR-BI. Οι μελέτες έδειξαν ότι τουλάχιστον σε ποντίκια ο υποδοχέας SR-BI προστατεύει από την αθηρογένεση.

Η πρώτη διαπίστωση για την επιτάχυνση της αθηρογένεσης λόγω έλλειψης του υποδοχέα SR-BI ήρθε από το εργαστήριο του Monty Krieger (305). Οι ερευνητές διασταύρωσαν ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια που δεν εκφράζουν καθόλου τον υποδοχέα SR-BI (SRBI -/-), με ποντίκια που δεν εκφράζουν καθόλου αποΕ (ΑποΕ -/-). Τα (SRBI -/- x ΑποΕ -/-) ζώα όταν τρέφονται με κανονική διατροφή (chow diet) χαρακτηρίζονται από αυξημένη χοληστερόλη του πλάσματος σε λιποπρωτεΐνες όπως VLDL και HDL, αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων που επιπλέουν στην πυκνότητα της HDL, καθώς και μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στην χολή, σε σχέση με τα (αποΕ -/- x SRBI +/+) ποντίκια. Η ανάλυση πολύ νεαρών ζώων (4-7 εβδομάδων) έδειξε ότι το διπλό διαγονιδιακό ποντίκι (SRBI-/- x αποΕ -/-) έχει στατιστικά πιο προχωρημένες αλλοιώσεις στην αορτή και στις στεφανιαίες αρτηρίες, ενώ δεν εμφανίστηκαν σχεδόν καθόλου αλλοιώσεις στα ποντίκια μάρτυρες (αποΕ -/-) της ίδιας ηλικίας. Επίσης όλα τα διπλά διαγονιδιακά ζώα (SRBI-/- x αποΕ -/-) πεθαίνουν πολύ νωρίς, σε ηλικία 9 εβδομάδων, λόγω ανώμαλης καρδιακής λειτουργίας. Προτάθηκε ότι η επιτάχυνση της αθηρωμάτωσης λόγω έλλειψης του υποδοχέα SR-BI μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες, όπως αλλαγή στην δομή ή στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, αλλαγή στην ροή της χοληστερόλης μέσα και έξω από το αρτηριακό τοίχωμα και αλλαγή

στην συνολική αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (π.χ. η μειωμένη ηπατική είσοδος της χοληστερόλης προκαλεί μειωμένη έκκριση χοληστερόλης στην χολή).

Δύο άλλες μελέτες ερεύνησαν την δράση του υποδοχέα SR-BI στην αθηρωμάτωση, χρησιμοποιώντας σταθερή ή παροδική υπερέκφραση του υποδοχέα SR-BI στο διαγονιδιακό μοντέλο του ποντικού που έχει βλάβη στο γονίδιο του υποδοχέα της LDL (LDLR). Για τον σκοπό αυτό, οι Arai et al (300) διασταύρωσαν ένα διαγονιακό ποντίκι που υπερεκφράζει τον υποδοχέα SR-BI ειδικά στο ήπαρ με ετερόζυγα ποντίκια για τον υποδοχέα της LDL (LDLR +/-). Τα (LDLR +/- x SRBI +/+) ποντίκια εμφανίζουν μειωμένα συνολικά επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα, που παρατηρείται τόσο στην χοληστερόλη της HDL (η πιο δραματική μείωση), όσο και στην χοληστερόλη των μη-HDL λιποπρωτεϊνών, καθώς και στην απολιποπρωτεΐνη αποΒ. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν είτε με κανονική διατροφή, είτε με διατροφή πλούσια σε λιπαρά και χοληστερόλη. Όταν τα ποντίκια τρέφονται με διατροφή πλούσια σε κεκορεσμένα λιπαρά/χοληστερόλη/χολικό οξύ παρατηρείται ότι υπάρχει λιγότερη αθηρογένεση στα ποντίκια (SR-BI +/+ x LDLR +/-), σε σχέση με τα διαγονιδιακά ποντίκια LDLR +/-. Η αντι-αθηρογενετική δράση του υποδοχέα SR-BI δεν εκδηλώνεται με διατροφή, απουσία χολικού οξέος, και πιστεύεται ότι πιθανώς η ανάπτυξη αθηρωμάτωσης από τα ετερόζυγα ποντίκια για τον υποδοχέα της LDL, απαιτεί πιο αθηρογενετική διατροφή σε σχέση με τα ομόζυγα ποντίκια που δεν εκφράζουν καθόλου τον υποδοχέα της LDL. Επίσης οι ερευνητές παρατήρησαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της χοληστερόλης των VLDL και LDL λιποπρωτεϊνών, αλλά όχι των HDL λιποπρωτεϊνών, και της έκτασης των αθηρωματικών αλλοιώσεων. Συμπέραναν λοιπόν ότι η προστατευτική δράση του υποδοχέα SR-BI οφείλεται κυρίως στην μείωση της χοληστερόλης των λιποπρωτεϊνών χαμηλότερης πυκνότητας, η οποία μπορεί να γίνεται με άμεσο (αυξημένος καταβολισμός) ή έμμεσο τρόπο (μειωμένη παραγωγή και έκκριση αποΒ).

Η πιο πρόσφατη μελέτη της επίδρασης του SR-BI στην αθηρογένεση προέρχεται από το εργαστήριο της Karen Kozarsky (353). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ένα ανασυνδυασμένο αδενοϊό που εκφράζει τον υποδοχέα SR-BI, για να επάγουν την παροδική ηπατική υπερέκφραση του υποδοχέα SR-BI, σε ομόζυγα ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα της LDL (LDL -/-). Τα ποντίκια διατηρούνται σε διατροφή πλούσια σε χοληστερόλη και κεκορεσμένα λίπη, για 2 με 12 εβδομάδες, εν συνεχεία μολύνονται με τον αδενοϊό και συνεχίζεται η ίδια διατροφή για ακόμη 4 εβδομάδες. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της χοληστερόλης της HDL μειώθηκαν σε μεγάλο βαθμό, αλλά στατιστικά δεν υπήρχε σημαντική μείωση στην χοληστερόλη των μη-HDL

λιποπρωτεϊνών, σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη των Arai et al (300). Τα ποντίκια εμφανίζουν μειωμένης έκτασης αθηρωματικές αλλοιώσεις, σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες. Το συμπέρασμα είναι ότι η ηπατική παροδική υπερέκφραση του SR-BI μπορεί να αναστέλλει την εξέλιξη των αρχικών (πρώιμων) και των πιο προχωρημένων αλλοιώσεων. Επιπλέον το μέγεθος των αθηρωματικών αλλοιώσεων στα επιμέρους ποντίκια σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα χοληστερόλης της HDL, τα οποία μετρήθηκαν μετά από την ένεση με τον αδενοϊό (σε αντίθεση με τους Arai et al). Στο μοντέλο αυτό προτείνεται ότι η αντιαθηρογενετική επίδραση του υποδοχέα SR-BI προκαλείται από τροποποιήσεις στην ροή της χοληστερόλης των λιποπρωτεϊνών HDL.

Μια κύρια διαφορά στις μελέτες που αναφέρθηκαν των Arai et al (300) και Kozarsky et al (353) είναι ότι οι πρώτοι ερευνητές χρησιμοποίησαν ετερόζυγα ποντίκια (LDL +/-) και οι δεύτεροι ομόζυγα ποντίκια (LDL +/+) για τον υποδοχέα της LDL, καθώς και διαφορετικά πρωτόκολα (χρήση διαγονιδιακών ή χρήση αδενοϊών αντίστοιχα). Εντούτοις το βασικό συμπέρασμα που εξάγεται από τις μελέτες αυτές είναι ότι η ηπατική υπερέκφραση του υποδοχέα SR-BI μπορεί να δράσει με προστατευτικό τρόπο ενάντια στην αθηρωμάτωση. Η δράση αυτή του υποδοχέα SR-BI μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες, όπως άμεση επίδραση στην δομή ή στα επίπεδα των κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών, άμεση αύξηση της συνολικής ροής της χοληστερόλης (αυξημένη αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης), ή έμμεση επίδραση στην είσοδο ή έξοδο της χοληστερόλης από το αρτηριακό τοίχωμα.

Ο υποδοχέας SR-BI έχει ανιχνευθεί στα μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών σε ποντίκια και σε ανθρώπους (191, 354). Είναι λοιπόν ευνόητο ότι αν ο υποδοχέας SR-BI έχει παρόμοιες λειτουργίες και στον άνθρωπο, όπως και στα ποντίκια, θα μπορέσει να χρησιμποποιηθεί ως θεραπευτικός στόχος κατά της αθηρωμάτωσης.

5) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I) αποτελεί το βασικό πρωτεϊνικό συστατικό της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL). Η αποA-I είναι απαραίτητη για την βιογένεση της HDL, συνδεέται με λιπίδια και λιποπρωτεΐνες, δρα ως ενεργοποιητής του ενζύμου Ακυλοτρανσφεράση της Λεκιθίνης-Χοληστερόλης (LCAT), και προάγει την επιλεκτική κυτταρική πρόσληψη της χοληστερόλης μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα καθαριστή 'scavenger' τάξης Β, τύπου Ι (SR-BI). Η διατριβή αυτή εστιάστηκε στην διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της δομής της αποA-I και της λειτουργίας της. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μεταλλαξιγένεση στον ανθρώπινο γονίδιο της αποA-I, με χρήση μεθοδολογίας PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης), και δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, μετά από επιμόλυνση και επιλογή. Δημιουργήθηκαν συνολικά 10 μεταλλάξεις, οι οποίες καλύπτουν την καρβοξυτελική και μέρος της κεντρικής περιοχής της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκαν νέες μεθοδολογίες για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών σε μεγάλη κλίμακα, με χρήση βιοαντιδραστήρων, και την απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών από το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες μελετήθηκαν για τις εξής λειτουργίες: 1) Ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, 2) Σύνδεση με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων (DMPC) και τον σχηματισμό της HDL, 3) Σχηματισμό ολιγομερών σε διάλυμα και 4) Ικανότητα σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI. Οι μελέτες αυτές αναμένετο να συμβάλλουν στην κατανόηση της δομής της αποA-I και την συμβολή της στην βιογένεση και τις λειτουργίες της HDL.

ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που επιλέχθηκαν ως αντιδραστήρια από τις διάφορες χημικές εταιρείες είχαν την μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα. Τα υλικά αγοράσθηκαν από τις εξής εταιρείες: Υλικά για την σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων από την εταιρεία Applied Biosystems, περιοριστικά ένζυμα (NotI, XhoI, SalI), και τα ένζυμα μετατροπής του DNA (T4 DNA λιγάση, Vent DNA πολυμεράση) από την New England Biolabs, αλκαλική φωσφατάση από το έντερο μόσχου (calf intestinal alkaline phosphatase) από την Stratagene (La Jolla, CA), υλικά για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) από την Perkin-Elmer, ^{35}S μεθειονίνη και ^{35}S dATP από την New England Nuclear. Βακτοτρυπτόνη (bactotryptone) και εκχύλισμα μυκήτων-βακτηρίων (bacto-yeast extract) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία VWR (Pittsburgh, PA).

Τα θρεπτικά μέσα για τις κυτταροκαλλιέργειες: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's modified Eagle's medium χωρίς μεθειονίνη και θρεπτικό μέσο Sf-900 II SFM, ο ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum), πενικιλλίνη, στρεπτομυκίνη, γλουταμίνη και θειϊκό G418 (GIBCO-BRL, Life Technologies, Grand Island, NY), IgGSorb (Enzyme Center (Boston, MA)), $CaCl_2$ (British Drug House), και οι πρωτεΐνες δείκτες μοριακής μάζας (New England Biolabs).

Τα αντιδραστήρια προσδιορισμού της ακολουθίας του DNA των μεταλλαγμένων γονιδίων (sequenase kit version 2.0) από την United States Biochemical (USB). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα αντιδραστήρια: νάτριο σημασμένο με ιώδιο 125 (Amersham Corp., Arlington Heights, IL), αλβουμίνη ορού μόσχου ελεύθερη λιπαρών οξέων (FAF-BSA), χοληστερόλη, χολικό νάτριο, 1-παλμιτοϋλ-2-ολεοϋλ-L-φωσφατιδυλοχολίνη, (1-palmitoyl-2-oleoyl-L-phosphatidylcholine, POPC), απρωτινίνη, βενζαμιδίνη (benzamidine), λευπεπτίνη, πεπστατίνη και PMSF από την Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, μεμβράνες διαπίδυσης (dialysis membranes) από την Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, CA, θρεπτικό μέσο Ham's F-12 και τρυψίνη/EDTA από την JRH Biosciences, Lenexa, KS, μεμβράνη ανοσο-αποτύπωσης PVDF από την Bio-Rad, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης από την Millipore, μονοκλωνικό αντίσωμα για την ανθρώπινη αποA-I, 5F-6, από την Ottawa Heart Institute, Οντάριο, Καναδά, αντίσωμα για την ανοσοσφαιρίνη IgG του ποντικού συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase) και αντιδραστήριο ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (Enhanced Chemiluminescence, ECL) από την Amersham.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων έχουν περιγραφεί αναλυτικά από τον Zannis (355).

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Καθαρισμός ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας.

Τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές συνετέθησαν στο μηχάνημα σύνθεσης DNA του Τομέα Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Βοστώνης με τη μέθοδο της στερεής φάσης τριεστερικού φωσφόρου. Μετά από αποπροστάτευση σε 30% NH_4OH για 12 ώρες και ξήρανση σε αντλία κενού επαναδιαλύθηκαν σε 50% φορμαμίδη και διάλυμα 1X TBE (10X TBE: 108 gr Tris base, 9.3 gr EDTA, 55 gr βορικό οξύ). Ακολούθησε διαχωρισμός των εκκινητών σε πήκτωμα 15% πολυακρυλαμίδης-7M ουρίας υπό σταθερή ισχύ 45 Watt για περίπου 5 ώρες. Μετά από την ηλεκτροφόρηση, οι ζώνες των ολιγονουκλεοτιδίων εντοπίσθηκαν με την τοποθέτηση του πηκτώματος πάνω σε φθορίζουσα (TLC) πλάκα υπό υπεριώδες φως. Ακολούθησε το κόψιμό τους από το πήκτωμα και η απομόνωση του DNA με ηλεκτροέκλουση με τη χρήση του ISCO μικροσυγκεντρωτικού μηχανήματος, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (356). Στη συνέχεια έγινε επεξεργασία του DNA αρχικά με ίσους όγκους φαινόλης:χλωροφορμίου (αναλογία όγκων 1:1) και κατόπιν χλωροφορμίου, κατακρήμνιση με απόλυτη αιθανόλη και επαναδιάλυση σε απεσταγμένο νερό. Η συγκέντρωση του κάθε εκκινητή καθορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης του DNA στα 260 nm σε Perkin Elmer Lambda φασματοφωτόμετρο. Μια μονάδα απορρόφησης (σε μήκος κύματος 260 nm) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 30 μg/μl μονόκλωνου DNA.

2. Αντιδράσεις υποκλωνοποίησης

Α. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις υποκλωνοποίησης ήταν τα NotI (10 units/μl), XhoI (20 units/μl) και SalI (20 units/μl). Οι ποσότητες του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά καθορίστηκαν από την

ποσότητα του DNA που επρόκειτο να υπεβληθεί σε πέψη (2-4 units/1 μg DNA). Τα ένζυμα αυτά δημιουργούν συμπληρωματικά άκρα. Οι συνθήκες πέψης του DNA με τα ανωτέρω περιοριστικά ένζυμα ήταν οι ακόλουθες: NotI (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT), XhoI (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT), SalI (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε BSA (100 μg/ml). Στην περίπτωση πέψης πλασμιδιακού DNA από παρασκευή πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (small scale plasmid prep) στο μείγμα της αντίδρασης προσετέθη Rnase A (10 μg Rnase A/5 μg DNA). Τα δείγματα επωάσθηκαν στους 37^O C, για 2-4 ώρες, εκτός αν ο κατασκευαστής είχε υποδείξει διαφορετική ιδανική θερμοκρασία πέψης. Ένα μικρό δείγμα από το μείγμα αντίδρασης αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, για να επιβεβαιωθεί η ολοκλήρωση της πέψης. Μετά την ολοκλήρωση της πέψης τα προϊόντα της αντίδρασης υπεβλήθησαν σε θέρμανση στους 65^O C για 10 λεπτά, για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.

Β. Αντίδραση λιγάσης

Οι συνθήκες της αντίδρασης της λιγάσης γενικώς ποικίλουν. Στην περίπτωσή μας στόχος ήταν να σχηματιστούν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια από τους μεγάλους φορείς με μικρά σχετικά ενθέματα. Οι κατάλληλες συγκεντρώσεις του φορέα και του ενθέματος υπολογίσθηκαν από τις τιμές j για το φορέα και το ένθεμα αντίστοιχα. Η τιμή j αντιστοιχεί στην ελάχιστη συγκέντρωση (μg/μl) η οποία είναι αναγκαία για την διατήρηση ανοικτής μορφής, ώστε να ευνοηθούν οι αντιδράσεις μεταξύ διαφορετικών μορίων. Η τιμή j περιγράφεται από την σχέση j (μg/μl) $=51.1*Mr^{-1/2}$, όπου Mr η μοριακή μάζα του DNA. Ο Whittaker (357) περιγράφει τις ελάχιστες τιμές του φορέα και του ενθέματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση της λιγάσης. Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 20 μl, με 2 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μg/ml BSA και 5 units ενζύμου T4 DNA λιγάση, με επώαση του μείγματος σε 16^O C για 12 ώρες.

Γ. Μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακά κύτταρα HB101

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Luria-Bertani (LB) μέσο ανάπτυξης βακτηρίων

Για κάθε λίτρο θρεπτικού μέσου διαλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό 10 γραμμάρια βακτο-τρυπτόνη (bactotryptone), 5 γραμμάρια εκχύλισμα μυκήτων-βακτηρίων (bacto-

yeast extract) και 5 γραμμάρια χλωριούχου νατρίου και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε σε 7.5 με προσθήκη καυστικού νατρίου. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο και ψύχθηκε τουλάχιστον στους 55^{O} C πριν από την προσθήκη των επιλεγμένων αντιβιοτικών.

Luria-Bertani (LB) μέσο με άγαρ

Σε κάθε λίτρο μέσου LB προστέθηκαν 15 γραμμάρια άγαρ πριν από την αποστείρωση σε αυτόκαυστο. Το μέσο ψύχθηκε στους 55^{O} C και ακολούθως προστέθηκαν τα επιλεγμένα αντιβιοτικά. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία με το LB–άγαρ αποθηκεύθηκαν στους 4^{O} C και επωάσθηκαν για τουλάχιστον μία ώρα στους 37^{O} C πριν να χρησιμοποιηθούν.

Αμπικιλλίνη

Παρασκευάστηκε συγκεντρωμένο (stock) διάλυμα άλατος νατρίου της αμπικιλλίνης σε απεσταγμένο νερό, σε συγκέντρωση 50 mg/ml (1000 X), αποστειρώθηκε με διήθηση μέσω φίλτρου μεγέθους πόρου 0.22 μm και αποθηκεύθηκε στους -20^{O} C. Το συγκεντρωμένο διάλυμα της αμπικιλλίνης προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 50 μg/ml .

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων SOC

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων (SOC) είναι ένα πλούσιο μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των κυττάρων μετά από μετασχηματισμό. Για την παρασκευή 100 ml θρεπτικού μέσου, διαλύθηκαν 2 ml βακτο-τρυπτόνης (bacto-tryptone) και 0.5 ml εκχυλίσματος μυκήτων-βακτηρίων (bacto-yeast extract) σε 97 ml απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε προσθήκη 0.2 ml από διάλυμα 5 M χλωριούχου νατρίου (NaCl) και 0.25 ml από διάλυμα χλωριούχου καλίου (KCl) 1 M και το διάλυμα αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο. Το μέσο αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως προστέθηκε 1 ml από διάλυμα $MgSO_4$ 1 M, 1 ml από διάλυμα $MgCl_2$ 1 M και 1 ml από διάλυμα γλυκόζης 1 M. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε μέσω φίλτρου μεγέθους πόρου 0.22 μ και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Διαδικασία μετασχηματισμού του πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακά κύτταρα HB101

Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν ειδικά παρασκευασμένα βακτηριακά κύτταρα, ικανά να υποβληθούν σε μετασχηματισμό (competent cells) που αγοράσθηκαν από την Sigma. Τα κύτταρα (που συντηρούνται στους -70^{O} C) απεψύχθησαν σε

υδατόλουτρο των 37^{O} C, και τοποθετήθηκαν απευθείας σε πάγο. Για τον μετασχηματισμό τους από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν 100 μl κυττάρων, στα οποία προστέθηκε όλη η αντίδραση της λιγάσης. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάσθησαν μισή ώρα σε πάγο και μεταφέρθηκαν σε 42^{O} C, για 45 δευτερόλεπτα, για να επιτευχθεί η είσοδος του DNA στα κύτταρα. Ακολούθησε προσθήκη 900 μl από το θρεπτικό μέσο SOC και επώαση μίας ώρας σε 37^{O} C, με συνεχή ανάδευση. Τέλος 100 μl και 200 μl από την κυτταρική καλλιέργεια απλώθηκαν σε ολόκληρη την επιφάνεια τρυβλίων με θρεπτικό μέσο LB και άγαρ, παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη (50 μg/ml). Η ανάπτυξη των αποικιών πραγματοποιήθηκε σε 10-12 ώρες στους 37^{O} C.

Οι αναπτυσσόμενες κυτταρικές αποικίες συλλέχθηκαν με τη χρήση μιας πλατινένιας θηλιάς που έχει αποστειρωθεί με θέρμανση, και ενβαπτίσθηκαν σε καλλιέργειες των 2 ml για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Το καθαρό DNA υπέστη πέψη με περιοριστικά ένζυμα για να πιστοποιηθεί ότι οι απομονωμένες αποικίες περιέχουν το σωστό πλασμίδιο. Οι θετικές αποικίες αποθηκεύθηκαν σε διάλυμα 20% γλυκερόλης (glycerol stocks).

Παρασκευή αποθέματος γλυκερόλης (glycerol stock)

Τα βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 20% (v/v), σε -70^{O} C. Συγκεκριμένα, 0.8 ml από την κυτταρική καλλιέργεια, αναμείχθηκαν με 0.2 ml αποστειρωμένης (σε αυτόκαυστο) γλυκερόλης και εψύχθησαν σε μείγμα ξηρού πάγου/αιθανόλης, πριν την αποθήκευσή τους.

3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα Ι : 50 mM γλυκόζη, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Διάλυμα ΙΙ : 0.2 N καυστικό νάτριο, 1% SDS

Διάλυμα ΙΙΙ : (60 ml οξικό κάλιο 5 M, 11.5 ml οξικό οξύ)/100 ml διαλύματος

Διάλυμα Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο).

Διάλυμα RNase A: Παρασκευάσθηκε αρχικά συγκεντρωμένο διάλυμα άλατος νατρίου της RNase A σε αποστειρωμένο νερό σε συγκέντρωση 5 mg/ml. Για την απενεργοποίηση των υπαρχόντων ενζύμων πέψης του DNA (Dnases) έγινε επώαση του

διαλύματος σε υδατόλουτρο για 5 λεπτά. Το διάλυμα της RNase A αποθηκεύθηκε σε μικρούς όγκους στους -20^{O} C.

Κορεσμός-εξισσορόπηση του διαλύματος της φαινόλης: Το διάλυμα της φαινόλης παρασκευάσθηκε όπως έχει περιγραφεί από τους Sambrook et al (356). Η φαινόλη υγροποιήθηκε σε υδατόλουτρο 60^{O} C και αναμείχθηκε με 8-υδροξυκυνολίνη (hydroxyquinoline) σε τελική συγκέντρωση 0.1% βάρους κατ'όγκον. Η υδροξυκυνολίνη αποτελεί αντιοξειδωτικό παράγοντα που είναι μερικός αναστολέας της RNάσης και ασθενής συνπλέχτης (chelator) των μεταλλικών ιόντων (358). Προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 M και ακολούθησε ανάδευση, με χρήση μαγνήτη, για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα αφέθηκε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και η υδατική φάση απομακρύνθηκε. Ακολούθησε προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M στο διάλυμα της φαινόλης και ανάδευση για 15 ακόμη λεπτά. Οι δύο φάσεις αφέθησαν να διαχωριστούν και η πάνω φάση επίσης απομακρύνθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μέχρι που το pH της φαινόλης έγινε μεγαλύτερο της τιμής 7.8. Μετά από την εξισσορόπηση (τον κορεσμό της φαινόλης με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl) και την απομάκρυνση της τελικής υδατικής φάσης, προστέθηκε 0.1 όγκος διαλύματος TE (pH 8.0), και 0.2 % β-μερκαπτοαιθανόλης. Το διάλυμα της φαινόλης επικαλύφθηκε με διάλυμα TE (pH 8.0) και αποθηκεύθηκε σε 4^{O} C, σε σκοτεινό δοχείο.

Α) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης

Ακολουθήθηκε σε γενικές γραμμές το πρωτόκολο που περιγράφουν οι Sambrook et al (356), με μερικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα:

α) Βακτηριακές καλλιέργειες των 2 ml αναπτύχθησαν σε γυάλινους σωλήνες που έχουν κατάλληλο μέγεθος, ώστε να επιτραπεί επαρκής αερισμός για 12-16 ώρες, σε LB θρεπτικό μέσο, παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη, σε συγκέντρωση 50 μg/ml.

β) 1.5 ml από την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε σωλήνες eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν για ένα λεπτό σε 14.0000 στροφές ανά λεπτό (σ.α.λ.) σε θερμοκρασία δωματίου.

γ) Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl του διάλυματος I

δ) Για την λύση των κυττάρων προστέθηκαν 200 μl του διάλυματος II , ακολούθησε ήπια ανάδευση αρκετές φορές για την πλήρη ανάμιξη των δύο διαλυμάτων, και επώαση στον

πάγο για 5 λεπτά

ε) Προστέθηκαν 150 μl του διάλυματος ΙΙΙ με γρήγορη ανάδευση με το βακτηριακό λύμα. Μετά από επώαση 5 λεπτών στον πάγο κατακρημνίσθηκαν οι κυτταρικές πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA και απομακρύνθηκαν ως ιζήματα μετά από φυγοκέντρηση 10 λεπτών σε 14.000 σ.α.λ., σε 4^{O} C.

στ) Το υπερκείμενο, που περιείχε τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωλήνες eppendorf και υπέστη επεξεργασία με RNAse A (0.2 mg/ml) για 20 λεπτά σε 37^{O} C, για την απομάκρυνση του RNA.

ζ) Ακολούθησε ένα στάδιο καθαρισμού με ίσο όγκο φαινόλης:χλωροφορμίου (αναλογία όγκων 1:1) και στη συνέχεια ένας δεύτερος καθαρισμός με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Μετά από φυγοκέντρηση 3 λεπτών (12.000 σ.α.λ., σε θερμοκρασία δωματίου), τα νουκλεϊκά οξέα συνελέχθησαν από την οργανική φάση του διαλύματος.

η) Στη συνέχεια τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίσθηκαν με 2.5 όγκους καθαρής αιθανόλης, σε -80^{O} C για 20 λεπτά. Το ίζημα που προέκυψε μετά από φυγοκέντρηση 15 λεπτών, σε 4^{O} C και σε 14.000 σ.α.λ. ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη και ξηράνθηκε υπό κενό. Τελικά το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύθηκε σε 40 μl αποστειρωμένου νερού. Η ποιότητα του πλασμιδίου ελέγθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Β) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

α) Βακτηριακές καλλιέργειες των 250 ml αναπτύχθησαν σε LB θρεπτικό μέσο, παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη (50 μg/ml).

β) Τα κύτταρα ελήφθησαν ως ίζημα, μετά από φυγοκέντρηση 10 λεπτών σε 6.000 σ.α.λ., σε 4^{O} C.

γ) Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε 5 ml από το διάλυμα Ι και υπέστησαν λύση με προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος ΙΙ, ελαφρά ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10 λεπτά.

δ) Ακολούθησε προσθήκη 7.5 ml του διάλυματος ΙΙΙ, ισχυρή ανάδευση, επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση 30 λεπτών, σε 5.000 σ.α.λ., στους 4^{O} C για την συνκατακρήμνιση των κυτταρικών πρωτεϊνών και του χρωμοσωμικού DNA.

ε) Το υπερκείμενο, που περιείχε τα νουκλεϊκά οξέα, υπέστη διήθηση με υαλοβάμβακα, και επωάσθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά με ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίσθηκαν με φυγοκέντρηση 20 λεπτών σε 10.000 σ.α.λ., σε 4^{O} C

στ) Το ίζημα υπέστη πλύση με 70% αιθανόλη, εξηράνθη και επαναδιαλύθηκε σε 5 ml διάλυματος ΤΕ

ζ) Η απομάκρυνση των μεγαλομοριακών RNA έγινε με ανάμιξη με ίσο όγκο 5 M LiCl, επώαση σε πάγο για 20 λεπτά και φυγοκέντρηση 20 λεπτών σε 10.000 σ.α.λ., σε 4^{O}C.

η) Τα υπόλοιπα νουκλεϊκά οξέα που περιέχονται στο υπερκείμενο κατακρημνίσθηκαν με 2.5 ml όγκους απόλυτης αιθανόλης

θ) Τα νουκλεϊκά οξέα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα ΤΕ και επωάσθηκαν με RNAse A (σε τελική συγκέντρωση 0.2 mg/ml) για 20 λεπτά σε 37^{O} C, για την καταστροφή του εναπομείνοντος RNA

ι) Ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη ίσου όγκου 13% πολυαιθυλεν-γλυκόλης (PEG-3.350) και 1/4 του όγκου 4 M NaCl, επώαση σε πάγο για μισή ώρα και φυγοκέντρηση 30 λεπτών σε 4^{O} C, σε 14.000 σ.α.λ.

κ) Το ίζημα υπέστη πλύση με 70% αιθανόλη, ξηράνθηκε και επαναδιαλύθηκε σε 400 μl διαλύματος ΤΕ

λ) Στο πλασμιδιακό διάλυμα προστέθησαν 0.4 gr CsCl (1 gr για κάθε ml ΤΕ) και 15 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Ακολούθησε η τοποθέτησή του σε σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quick seal-Beckman). Ο σωλήνας συμπληρώθηκε με διάλυμα ΤΕ/CsCl σε αναλογία 1:1 (βάρος κατ'όγκον) και υπεβλήθη σε υπερφυγοκέντρηση στις 60.000 σ.α.λ., σε 4^{O} C, για 12 ώρες, με VT70.1Ti κεφαλή φυγοκέντρου, σε υπερφυγόκεντρο Beckman XL-90

μ) Συλλέχθηκε η ζώνη του πλασμιδιακού-υπερελικωμένου (supercoil) DNA με πολλή προσοχή για να μην αναμιχθεί με το γενωμικό DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο απομακρύνθηκε με διάλυμα ισοπροπανόλης κορεσμένης σε ΤΕ. Ταυτόχρονα, λόγω αύξησης του όγκου του διαλύματος ακολούθησε εκχύλιση με καθαρή ισοπροπανόλη.

ν) Το διάλυμα με το πλασμιδιακό DNA τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης (Spectra/Por). Η διαπίδυση έγινε για 6-8 ώρες σε καθαρό απιονισμένο νερό όγκου 4 λίτρων με μια αλλαγή του νερού.

ξ) Στη συνέχεια το διαλυμένο πλασμίδιο μεταφέρθηκε σε σωλήνες eppendorf, εκχυλίσθηκε με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνίσθηκε με διάλυμα οξικού νατρίου (pH 5.2), τελικής συγκέντρωσης 0.3 M και με 2.5 όγκους απόλυτης αιθανόλης

ο) Το DNA-ίζημα υπέστη πλύση με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού. Η ποσότητα και η ποιότητα του DNA ελέχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέτρηση της απορρόφησής του έγινε στα 260 nm με φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 15. Μία μονάδα οπτικής πυκνότητας

αντιστοιχεί στην απορρόφηση πλασμιδιακού DNA που έχει συγκέντρωση 50 μg/ml (σε μήκος κύματος 260 nm).

Γ) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με στήλη QIAGEN

Ένας άλλος τρόπος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα είναι η χρησιμοποίηση στηλών QIAGEN (Qiagen-tip 500), με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, και παρέχει μέχρι και 500 μg DNA/στήλη.

4. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Α. Ηλεκτροέκλουση

Η απομόνωση τμημάτων DNA με ηλεκτροέκλουση έγινε με τη χρήση του ISCO μικροσυγκεντρωτικού μηχανήματος με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (356). Ακολουθεί επιπλέον καθαρισμός με ίσους όγκους φαινόλης:χλωροφορμίου (αναλογία όγκων 1:1) και χλωροφορμίου και κατακρήμνιση με 3 Μ οξικό νάτριο (1/10 του όγκου), (pH 5.2), και 2.5 όγκους απόλυτης αιθανόλης. Το DNA υπέστη πλύση με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού.

Β. Χρήση στήλης G–10

Ένας αρκετά γρήγορος και πολύ αποτελεσματικός εναλλακτικός τρόπος καθαρισμού κομματιών DNA από πήκτωμα αγαρόζης βασίστηκε στην κλασμάτωσή τους με στήλη μοριακής διήθησης (G–10), ακριβώς όπως έχει περιγραφεί από τους Wang και Rossman (359)

5. Ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με χρήση ως μήτρα το δίκλωνο DNA (sequencing)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα αποδιάταξης: 2 N NaOH , 2 mM EDTA

Διάλυμα υβριδοποίησης (sequenase annealing buffer): 20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 25 mM NaCl

Μείγμα dNTP: 0.75 μM dATP, 0.75 μM dGTP,0.75 μM dTTP,0.75 μM dCTP

Διάλυμα 10X TBE: **8.3 M ουρία, 0.89 M βάση Tris, 0.89 M βορικό οξύ**

Το δίκλωνο DNA, που προέρχεται από την κλωνοποίηση της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την μέθοδο προσδιορισμού της πρωτοταγούς διάταξης του κατά Sanger (360). Βασική προϋπόθεση είναι η αποδιάταξη του DNA με θέρμανση ή άλκαλι. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του δίκλωνου DNA φαίνονται στον πίνακα 6 (τμήμα 2 των αποτελεσμάτων). Ο προσδιορισμός έγινε με την χρήση των ετοίμων αντιδραστηρίων (sequenase kit της USB), που στηρίζεται στην χρήση μιας τροποποιημένης μορφής της πολυμεράσης του ιού T7 (Sequenase version 2.0), με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Λόγω του μεγάλου μεγέθους της μήτρας του DNA (18.000 bp) χρησιμοποιήθηκαν 10 μg υπερελικωμένου DNA σε τελικό όγκο 20 μl που περιείχε 2 μl από το διάλυμα αποδιάταξης. Το δείγμα επωάσθηκε για μισή ώρα σε 37^{O} C και ακολούθησε εξουδετέρωση με 3 M οξικό νάτριο, pH 5.2 (1/10 του όγκου) και κατακρήμνιση με προσθήκη 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Το DNA επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 7 μl νερού σε σωλήνα μικρό, ειδικό για PCR, και αναμείχθηκε με 7 pmoles εκκινητή και 2 μl διαλύματος υβριδοποίησης (sequenase annealing buffer, 5X). Το μείγμα εισήχθη σε μηχάνημα PCR υπό τις εξής συνθήκες: θέρμανση για 2 λεπτά στους 65^{O} C και πτώση σε θερμοκρασία δωματίου σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Η έναρξη της αντίδρασης προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής του DNA (sequencing) έγινε με την προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων

1 μl 0.1 M DTT

2 μl από το μείγμα σήμανσης (Labeling mix), αραιωμένο σε νερό 1:5

0.5 μl ^{35}S d ATP και

2 μl από το ένζυμο sequenase version 2.0, αραιωμένο 1:8

Ακολούθησε επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Για τον τερματισμό της αντίδρασης 3.5 μl από τα μείγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες eppendorf που περιείχαν ο καθένας 2.5 μl αναλόγου διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddNTPs) και έχουν προθερμανθεί σε 37^{O} C για 10-15 λεπτά. Η ενσωμάτωση των ddNTPs στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA αναστέλει την παραπέρα επιμήκυνση. Οι αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν με την προσθήκη 4 μl διαλύματος τερματισμού (stop solution).

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 6% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-7M ουρίας, σε διάλυμα 1X TBE, υπό σταθερή τάση 1500 Volts για περίπου 2 ώρες, σε 55^{O} C. Μετά την

ηλεκτροφόρηση έγινε ξήρανση του πηκτώματος με δύο τρόπους :α) μεταφορά σε χαρτί Whatman και ξήρανση υπό κενό για 1 ώρα σε 75^{O} C, ή β) μεταφορά σε 10% οξικό οξύ και ξήρανση απευθείας πάνω στην πλάκα της ηλεκτροφόρησης που είχε επεξεργσθεί με 5 ml από το διάλυμα Α (100 mM αιθανόλη και 300 μl γ-MTS) και 150 μl από 10% οξικό οξύ, σε ένα φούρνο μικροκυμάτων για 30-40 λεπτά, με ισχύ 30%. Τέλος το πήκτωμα εξετέθη σε φίλμ Kodak-Biomax, σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες.

6. Καλλιέργειες κυττάρων και πειράματα επιμόλυνσης

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα επιμόλυνσης είναι η σειρά C127 που προέρχεται από όγκο μαστικού αδένα του ποντικού (ATCC CRL 1616). Η σειρά αυτή δεν εκφράζει καμμιά απολιποπρωτεΐνη και αποτελεί ένα πολύ καλό φορέα μετασχηματισμού με τα πλασμίδια που βασίζονται στον ϊό βοΐου θηλώματος (bovine papilloma virus-BPV). Τα κύτταρα C127 διατηρούνται σε μονοστοιβάδες σε επωαστή 37^{O} C και ατμόσφαιρα 5% CO_2, σε θρεπτικό μέσο DMEM, παρουσία 10% ορού εμβρύου μόσχου, 100 μονάδες/ml πενικιλλίνη, 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM γλουταμίνη, με ανανέωση του θρεπτικού μέσου δύο φορές την εβδομάδα.

Α. Επιμόλυνση κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια - Τεχνική της συν-κατακρήμνισης του DNA με $Ca_3(PO_4)_2$

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

15% γλυκερόλη

7.5 γραμμάρια γλυκερόλης διαλύθησαν σε 25 ml διαλύματος 2X HBS. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 50 ml με διπλά απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα υπέστη διήθηση μέσα από φίλτρο Nalgene 0.2 μ και διατηρήθηκε στους 4^{O} C.

2M $CaCl_2$

Το $CaCl_2$ προήλθε από την BDH. Παρασκευάσθηκε διάλυμα 2 M $CaCl_2$ σε διπλά απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα υπέστη διήθηση μέσα από φίλτρο Nalgene μεγέθους πόρου 0.2 μ, χωρίσθηκε σε μικρούς όγκους σε αποστειρωμένα γυάλινα σωληνάρια των 9 ml και διατηρήθηκε στους -80^{O} C.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Σύσταση διαλύματος 2X HBS

Συστατικά	MW	MM	G/L
NaCl	58,44	274	16
KCl	74,56	10	0,74
$Na_2HPO_4*7H_2O$	268,07	1,5	0,4
Δεξτρόζη	180,14	12	2
Hepes	260,3	42	10

Το pH του διαλύματος ρυθμίσθηκε στην μέγιστη τιμή 7±0.1. Το διάλυμα υπέστη διήθηση μέσα από φίλτρο Nalgene μεγέθους πόρου 0.2 μ και διατηρήθηκε στους 4^{O} C.

Η επιμόλυνση των κυττάρων με την τεχνική της συν-κατακρήμνισης DNA με $Ca_3(PO_4)_2$, λόγω της μεγάλης αποτελεσματικότητάς της αποτελεί την κύρια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την παροδική και μόνιμη είσοδο και έκφραση του ξένου DNA σε μεγάλο αριθμό κυττάρων. Οι Graham και Van der Eb (361) έδειξαν ότι η ανάμειξη του DNA με $CaCl_2$ και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων διευκολύνει την είσοδο του ιζήματος DNA-$Ca_3(PO_4)_2$, στα κύτταρα μιας καλλιέργειας, που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές θηλαστικών με μερικές τροποποιήσεις, ανάλογα με την περίπτωση.

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά C127 και δύο τύποι τρυβλίων p60 (με διάμετρο 60 mm) και p100 (με διάμετρο 100 mm) καθώς και φιάλες T-25, συνολικής επιφάνειας 25 cm^2. Για την παροδική επιμόλυνση των κυττάρων και την σήμανση τους με ^{35}S μεθειονίνη χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία p60, ενώ τα p100 τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν για την μόνιμη επιμόλυνση. Εικοσιτέσσερις ώρες πριν από την διαδικασία της επιμόλυνσης, καλλιέργειες εκθετικά αυξανόμενων κυττάρων υπέστησαν επεξεργασία με τρυψίνη-EDTA και εστρώθησαν σε συγκέντρωση $5*10^5$ κυττάρων σε τρυβλίο p60 και 10^6 κυττάρων σε τρυβλίο p100, σε μέσο που περιείχε DMEM και 10% ορού εμβρύου μόσχου. Για την επιμόλυνση με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια έκφρασης της αποA-I, παρασκευάσθηκε ένα μείγμα που περιείχε νερό, DNA και $CaCl_2$ στις ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα 5 και προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα σε ίσο όγκο διαλύματος 2X HBS (πίνακας 4), παρουσία ελαφρού ρεύματος αέρα. Από τον πίνακα 5 φαίνεται ότι στα τρυβλία p60 χρησιμοποιήθηκαν 17 μg DNA σε τελικό όγκο

500 μl, ενώ οι ποσότητες ήταν διπλάσιες για τα τρυβλία p100. Ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με το διάλυμα $Ca_3(PO_4)_2$ για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη του δείγματος στην κυτταρική μονοστοιβάδα. Τα κύτταρα επωάσθηκαν για 3.5-4 ώρες σε 37^O C, και σε 5% ατμόσφαιρα CO_2, ώστε να επιτραπεί η προσκόλληση του συμπλέγματος DNA-$Ca_3(PO_4)_2$ στην κυτταρική επιφάνεια. Για την απομάκρυνση του μη προσκολλημένου DNA ακολούθησε πλύσιμο της κυτταρικής μονοστοιβάδας με μέσο DMEM, απουσία ορού. Η αποτελεσματικότητα της παροδικής έκφρασης του εισαχθέντος DNA είναι δυνατόν να αυξηθεί με επεξεργασία των κυττάρων με γλυκερόλη (glycerol shock), για τόσο χρονικό διάστημα που δεν αποβαίνει τοξικό για την καλλιέργεια και εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Τα κύτταρα C127 επωάσθηκαν με 3 ml του διάλυματος 15% γλυκερόλης σε 1X HBS για 1 λεπτό. Τρεις ώρες μετά την προσθήκη του DNA, τα κύτταρα υπέστησαν πλύση με μέσο DMEM, παρουσία ορού, δύο φορές, για την πλήρη απομάκρυνση της γλυκερόλης και τελικά επωάσθηκαν με το ίδιο θρεπτικό μέσο και ορό σε 37^O C, σε ατμόσφαιρα 5% CO_2, για 24 ώρες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Συνθήκες επιμόλυνσης κυττάρων

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Τρυβλίο p60	Τρυβλίο p100
DNA (17 μg/μl)	1 μl	2 μl
2 M $CaCl_2$	31 μl	62 μl
Νερό	219 μl	446 μl
2X HBS	250 μl	500 μl
Τελικός όγκος	500 μl	1000 μl

Β. Ραδιοσήμανση κυττάρων με ^{35}S-μεθειονίνη μετά από παροδική επιμόλυνση.

Η ραδιοσήμανση της πρωτεΐνης που παρήχθη από τα παροδικά επιμολυσμένα κύτταρα έγινε ως εξής: εικοσιτέσσερις ώρες μετά την επιμόλυνση των κυττάρων με την τεχνική της συν-κατακρήμνισης DNA-$Ca_3(PO_4)_2$ που περιγράφηκε παραπάνω, τα κύτταρα υπέστησαν πλύση 2 φορές με θρεπτικό μέσο DMEM (απουσία ορού), το οποίο δεν περιείχε μεθειονίνη ή κυστεΐνη, αλλά περιείχε 2 mM γλουταμίνη και 10 μM από τον

παράγοντα επιλογής $CdCl_2$. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες με το παραπάνω θρεπτικό μέσο. Σε αυτό το διάστημα επιτεύχθη η επιλογή των κυττάρων που φέρουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το γονίδιο της μεταλλοθειονίνης, λόγω της ύπαρξης του $CdCl_2$ στο μέσο της καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα υπέστησαν πλύση δύο φορές με το ίδιο θρεπτικό μέσο και τελικώς επωάσθηκαν με 2 ml από το διάλυμα και 0.25 μCi ^{35}S μεθειονίνη για κάθε p60, ενώ σε τρυβλία p100 προστέθηκε 0.5 μCi ^{35}S μεθειονίνης. Τα κύτταρα ραδιοσημάνθηκαν για 12 ώρες και αργότερα συλλέχθηκε το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της εκκριθείσας αποA-I.

Γ. Επιμόλυνση κυττάρων με σκοπό την δημιουργία μόνιμων κυτταρικών σειρών που εκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες

Πραγματοποιήθηκε αρχικά επιμόλυνση των κυττάρων, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, επεξεργασία με γλυκερόλη (glycerol shock) και αλλαγή του θρεπτικού μέσου με επώαση επί 48 ώρες. Ακολούθησε επεξεργασία των κυττάρων με τρυψίνη-EDTA (για ένα λεπτό) μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια του τρυβλίου και μεταφορά σε μεγαλύτερα τρυβλία p100, σε διαφορετικές αραιώσεις 1:10, 1:20, 1:40, 1:80. Τα τρυβλία επωάσθηκαν με μέσο που περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου και 10 μM $CdCl_2$ (για τις αραιώσεις 1:20 και 1:40 χρησιμοποιήθηκε η διπλάσια ποσότητα (20 μM) $CdCl_2$). Τα κύτταρα επωάσθηκαν για χρονικό διάστημα περίπου 12-15 ημερών, με αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε 3 ημέρες, μια διαδικασία που οδήγησε στον θάνατο των μη επιμολυσμένων κυττάρων λόγω της τοξικότητας του $CdCl_2$ και την επιβίωση μόνο των κυττάρων που φέρουν τον ανασυνδυασμένο φορέα PBMT3XA-I, που φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο κάδμιο. Αυτά τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε μικρές διακριτές απομονωμένες αποικίες, οι οποίες συλλέχθηκαν με χρήση αποστειρωμένων κυλίνδρων. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε τρυβλία p60, δύο για κάθε αποικία (κλώνο) και καλλιεργήθηκαν μέχρι να φθάσουν στο μέγεθος των $5*10^5$ κυττάρων ανά τρυβλίο. Στο στάδιο αυτό το ένα τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε για ραδιοσήμανση, με σκοπό την μελέτη της πρωτεΐνης που παράγει ο κλώνος, ενώ το άλλο τρυβλίο p60 χρησιμοποιήθηκε για την ψύξη του κλώνου.

Δ. Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών από μόνιμα μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές.

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, όταν ο κλώνος στο τρυβλίο p60 φθάσει σε αριθμό $5*10^5$ κυττάρων είναι έτοιμος για ραδιοσήμανση. Η διαδικασία της

ραδιοσήμανσης των κλώνων είναι η ίδια που έχει περιγραφεί και κατά την παροδική επιμόλυνση των κυττάρων (τμήμα 6Β των μεθόδων), με την διαφορά ότι η περίοδος επώασης των κυττάρων με ^{35}S μεθειονίνη διήρκεσε μόνο 5 ώρες. Μετά το πέρας της σήμανσης συλλέχθηκε το μέσο καλλιέργειας για παραπέρα ανάλυση.

Ε. Ψύξη και απόψυξη κλώνων

Ψύξη των κλώνων

Η συλλογή και η ψύξη των κλώνων έγινε όταν ο αριθμός των κυττάρων έχει ξεπεράσει τα $5*10^5$ κύτταρα στο τρυβλίο p60. Αρχικά τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση της τρυψίνης-EDTA και μεταφέρθηκαν σε 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM παρουσία 10% ορού και των αντιβιοτικών πενικιλλίνης-στρεπτομυκίνης. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά, σε 1.500-2.000 σ.α.λ., για την πλήρη απομάκρυνση της τρυψίνης, που έμεινε στο υπερκείμενο. Στο κυτταρικό ίζημα προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM, παρουσία 10% DMSO, και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες μικροφιάλες. Η ψύξη των μικροφιαλών γίνεται αρχικά σε καταψύκτη -80^O C, για 24 ώρες και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο. Υπό τις συνθήκες αυτές είναι δυνατή η διατήρηση των κυττάρων για την μετέπειτα χρήση τους.

Απόψυξη των κλώνων

Η απόψυξη των κυτταρικών κλώνων πρέπει να είναι εξαιρετικά ταχεία. Οι μικροφιάλες με τα ψυχθέντα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνα των 15 ml (falcon), όπου αναμείχθηκαν με 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (DMEM, 10% ορού). Ακολούθησε φυγοκέντρηση 5 λεπτών, σε 1.500-2.000 σ.α.λ., που επέτρεψε την απομάκρυνση του DMSO από τα κύτταρα και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε καινούργιο πλήρες θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα στο νέο θρεπτικό υλικό μεταφέρθηκαν για καλλιέργεια σε τρυβλίο p60, επωάσθηκαν κανονικά σε 37^O C, με παροχή 5% CO_2 με αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε 3 ημέρες.

ΣΤ. Καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα των μόνιμα μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών (τεχνολογία περιστρεφόμενων κυλινδρικών φιαλών) (roller bottles)

Για την απομόνωση μεγάλων ποσών καθαρής πρωτεΐνης για τις λειτουργικές μελέτες που περιγράφονται κατωτέρω ήταν απαραίτητη η συλλογή μέσου καλλιέργειας που περιέχει μεγάλες ποσότητες από τις μεταλλαγμένες μορφές της

αποA-I. Για τον σκοπό αυτό οι κυτταρικές σειρές που βρέθηκε ότι έχουν την μεγαλύτερη παραγωγή μιας συγκεκριμένης μεταλλαγμένης μορφής αποA-I καλλιεργήθηκαν σε μεγάλη κλίμακα, με την τεχνολογία των περιστρεφόμενων κυλινδρικών φιαλών (roller bottles), με την οποία είναι εφικτή η συλλογή τουλάχιστον 1 λίτρου μέσου καλλιέργειας. Τα κύτταρα στις κυλινδρικές φιάλες αναπτύχθηκαν σε πορώδη μικροσφαιρίδια από μόλυβδο, διαμέτρου 100 μm που καλύπτονται από κολλαγόνο. Η επικάλυψη από κολλαγόνο παρέχει το υλικό για την κυτταρική προσκόλληση. Τα μικροσφαιρίδια παρέχουν μεγάλη επιφάνεια, οπότε επιτρέπεται η ταυτόχρονη καλλιέργεια των κυττάρων σε μεγάλη πυκνότητα και μικρό όγκο.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σταδιακά, ξεκινώντας από φιάλες T-25 (συνολικής επιφάνειας 25 cm^2), σε θρεπτικό μέσο DMEM, παρουσία 10% ορού εμβρύου μόσχου. Όταν έφθασαν σε πλήρη ανάπτυξη (confluency) έγινε επεξεργασία με τρυψίνη/EDTA και μεταφορά σε δύο φιάλες επιφάνειας T-75 (συνολικής επιφάνειας 75 cm^2). Από τις φιάλες T-75 τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε κυλινδρικές φιάλες (roller bottles), επιφάνειας 850 cm^2 και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε επωαστή 37° C. Ακολούθησε περιστροφή των κυλινδρικών φιαλών με ρυθμό μίας στροφής το λεπτό με σκοπό την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια της κυλινδρικής φιάλης. Όταν τα κύτταρα έφθασαν σε ποσοστό ανάπτυξης (confluency) 75-85 % προστέθηκαν 10 ml από αποστειρωμένα κολλαγονούχα μικροσφαιρίδια. Τα σφαιρίδια αυτά είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο για 30 λεπτά σε διάλυμα PBS και επωασθεί σε θρεπτικό μέσο DMEM, παρουσία 1% ορού εμβρύου μόσχου, για τουλάχιστον μία ώρα, για την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από το μέσο. Οι κυτταρικές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στον επωαστή και συνέχισαν την περιστροφή με την ίδια αργή ταχύτητα, για επιπλέον 2-3 μέρες, μέχρι που επετεύχθη η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης και η προσκόλλησή τους στα σφαιρίδια. Τελικά τα κύτταρα επωάσθηκαν με 300 ml από θρεπτικό μέσο DMEM, με 5% ορού εμβρύου μόσχου και 10 μM $CdCl_2$, και η ταχύτητα της περιστροφής αυξήθηκε σε 7 στροφές ανά λεπτό. Η ανανέωση του θρεπτικού μέσου έγινε δύο φορές την εβδομάδα.

Για την συλλογή του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πρωτεϊνών, τα κύτταρα υπέστησαν πλύση δύο φορές με 30 ml θρεπτικού μέσου DMEM, απουσία ορού εμβρύου μόσχου, και επωάσθηκαν με 100 ml με το ίδιο θρεπτικό μέσο για 2 ώρες. Ακολούθησε μία επιπλέον έκπλυση, ολονύκτια επώαση με 100 ml από

το ίδιο θρεπτικό μέσο και συλλογή του μέσου καλλιέργειας. Η συλλογή του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε δύο φορές την εβδομάδα και η συντήρησή του έγινε με την προσθήκη 1 mM EDTA, 0.01 % NaN_3 και των αναστολέων των πρωτεασών απρωτινίνη (aprotinin) (10 μM) και βενζαμιδίνη (benzamidine) (10 μM).

7. Χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

PBS: 20 gr NaCl, 0.5 gr KCl, 2.87 gr Na2HPO4, 0.5 gr KH2PO4

Μείγμα λύσης (5X Lysis mix): 5% SDS, 5% Triton X-100, 2.5% DOC σε διάλυμα PBS

Μείγμα λύσης με BSA (Lysis mix+BSA): περιέχει 5 mg/ml BSA σε μείγμα λύσης (Lysis mix) και 10 mM μη σημασμένη μεθειονίνη

Μείγμα λύσης χωρίς SDS (Lysis mix-SDS): 1% Triton X-100(κατά βάρος), 0.5% DOC σε διάλυμα PBS

Αποδιατακτικό διάλυμα (2D Lysis buffer): 57% ουρία, 2% NP-40, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη και αμφολύτες : 4.8% με πεδίο pH 5-8, 1.2% με πεδίο pH 2.5-4, 1.2% με πεδίο pH 4-6.

Αντίσωμα για την ανθρώπινη αποA-I που προέρχεται από κουνέλι (δώρο του Δρ. Fruchard, Πανεπιστήμιο Lille, Γαλλία).

ΥΛΙΚΑ

Παρασκευή πλυμμένης Staph A

Η staph A είναι ένα παρασκεύασμα IgGSorb, με αραίωση 10% και έχει ικανότητα δέσμευσης 2 mg IgG/ml, σε συγκέντρωση 10%. Διατίθεται από το Enzyme Center 36, USA, σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Πριν από την χρήση της staph A απαιτείται πλύσιμο που έγινε με τον ακόλουθο τρόπο: Όλο το περιεχόμενο της φιάλης διαλύθηκε σε 9.8 ml απεσταγμένο νερό και επεξεργάσθηκε με υπερήχους για 10 λεπτά, μέσα σε παγόλουτρο, χρησιμοποιώντας ειδική συσκευή που παράγει υπερήχους. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε σωληνάρια eppendorf σε μικρότερες ποσότητες των 1.5 ml και φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα σε 13.000 σ.α.λ. σε μικροφυγόκεντρο Beckman. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με προσοχή και το ίζημα επαναδιαλύθηκε στον υπόλοιπο όγκο του νερού με ισχυρή ανάδευση σε μικρό όγκο του υπερκειμένου. Το ίζημα υπεβλήθη σε

πλύση μια φορά σε 1 ml διάλυματος Lysis mix+BSA, με ανάδευση και κατακρημνίσθηκε με φυγοκέντρηση σε 13.000 σ.α.λ. για 30 δευτερόλεπτα. Το πλύσιμο επαναλήφθηκε δύο φορές ακόμη, και η staph A (ίζημα) τελικά επαναδιαλύθηκε σε τελικό όγκο 10 ml Lysis mix+BSA. Η πλυμμένη staph A διατηρήθηκε στους 4^{O} C, και χρησιμοποιήθηκε μέσα σε χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων από την παρασκευή της. Απαιτείται ισχυρή ανάδευση πριν από την κάθε χρήση της για την ομογενοποίηση του παρασκευάσματος.

BSA

Είναι αλβουμίνη ορού μόσχου, 98% καθαρή, χωρίς λιπαρά οξέα (Sigma).

Ανοσοκατακρήμνιση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών

Πραγματοποιήθηκε ολονύκτια σήμανση των πρωτεϊνών με ^{35}S μεθειονίνη, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Το θρεπτικό μέσο διαχωρίστηκε σε δύο σωλήνες eppendorf του 1 ml. Στη συνέχεια τα κύτταρα υπέστησαν πλύση με διάλυμα PBS, επωάσθηκαν με 1 ml μείγματος λύσης χωρίς SDS, (Lysis mix-SDS) και συλλέχθηκε το κυτταρικό λύμα. Το μέσο καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε 10 λεπτά, σε 13.000 σ.α.λ. για την απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών υπολλείματων, και το υπερκείμενο μεταφέρθη σε καθαρούς σωλήνες eppendorf. Στους σωλήνες προσετέθη 5X Lysis mix, που παρέχει απορρυπαντικά σε τελικές συγκεντρώσεις 0.5% Triton X-100, 0.25% DOC και 0.5% SDS. Συνήθως σε ένα τυπικό δείγμα προστίθενται 110 μl 5X Lysis mix/1 ml μέσου καλλιέργειας. Ακολούθησε η προσθήκη 100 μl πλυμμένης πρωτεΐνης staph A, που είχε προηγουμένως υποβληθεί σε πολύ καλή ανάδευση για να είναι ομογενής. Το μείγμα επωάσθηκε μια ώρα σε 4^{O} C, με συνεχή ανάδευση, για να επιτευχθεί η μη ειδική δέσμευση των διαφόρων πρωτεϊνών που ευρίσκονται στο μέσο καλλιέργειας, με την staph A. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωλήνες eppendorf και επωάσθηκε παρουσία 10 μl αντισώματος για την ανθρώπινη αποA-I, σε 4^{O} C για 12 ώρες, με συνεχή ανάδευση, για να επιτευχθεί η δέσμευση των πρωτεϊνών στο αντίσωμα. Την επόμενη μέρα ακολούθησε επιπλέον προσθήκη 100 μl staph A και επώαση μιας ώρας σύμφωνα με τον προαναφερθέντα τρόπο. Αυτό το στάδιο επέτρεψε την δέσμευση του συμπλόκου αποA-I-αντισώματος από την staph A. Η staph A ακολούθως κατακρημνίσθηκε μετά από φυγοκέντρηση 30 δευτερολέπτων σε 13.000 σ.α.λ. και ξεπλύθηκε ακόμη μια φορά με 1 ml Lysis mix+BSA και 3 φορές με 1 ml του ίδιου διαλύματος (Lysis mix) χωρίς BSA. Στο κάθε στάδιο πλυσίματος η staph A κατακρημνίσθηκε με φυγοκέντρηση σε 13.000 σ.α.λ. για 30 δευτερόλεπτα και

επαναδιαλύθηκε με ισχυρή ανάδευση. Μετά το τελευταίο πλύσιμο, το ίζημα (που περιέχει την πρωτεΐνη, το αντίσωμα, και την staph A) επαναδιαλύθηκε σε 60 μl αποδιατακτικού διαλύματος πρωτεϊνών (2D lysis buffer) και υπεβλήθη σε ψύξη και απόψυξη τρεις φορές από τους -80^{O} C σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ισχυρή ανάδευση για την πλήρη επαναδιάλυσή του. Το ίζημα διατηρήθηκε στους -80^{O} C και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 5 λεπτών κάθε φορά πριν την χρησιμοποίησή του.

Για την εκτίμηση του ποσού παραγωγής των μεταλλαγμένων αποA-I πρωτεϊνών της κάθε κυτταρικής σειράς έγινε μέτρηση του ποσού ραδιενέργειας του δείγματος ως εξής: το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά για να κατακρημνισθεί η staph A. Στη συνέχεια 2 μl από το υπερκείμενο διαλύθηκαν σε 10 ml διαλύματος σπινθηρισμού και μετρήθηκαν σε μετρητή σπινθηρισμού (LKB scintillation counter), με μάρτυρα 10 ml διαλύματος σπινθηρισμού.

8. Ανάλυση των πρωτεϊνών των κυτταρικών σειρών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-παρουσία SDS έγινε με την χρήση κατακόρυφων συσκευών διαστάσεων 17 X 20.5 cm και πάχους 0.5 mm. (vertical slab gels), ακολουθώντας το πρωτόκολο που έχει περιγραφεί από τον Zannis (355). Πιο αναλυτικά, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) αποτελείται από 0.12% ακρυλαμίδιο, 0.0032% δισ-ακρυλαμίδιο, 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.017% υπερθειϊκό αμμώνιο (ammonium persulphate), 0.1% TEMED. Το πήκτωμα συσσώρευσης του δείγματος (stacking gel) αποτελείται από 2.92% ακρυλαμίδιο, 0.08% δισ-ακρυλαμίδιο, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.03% υπερθειϊκό αμμώνιο και 0.2% TEMED. Το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 0.0125 M Tris, 0.01 M γλυκίνη και 0.0002 M SDS.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε υπό σταθερή τάση 50 Volts, αρχικά για μία ώρα, και μετά η τάση αυξήθηκε στα 100 Volts και η ηλεκτροφόρηση συνεχίστηκε μέχρι να προχωρήσει η χρωστική κυανούν της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue) στο τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού. Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες στα πηκτώματα σταθεροποιήθηκαν (fixed) σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος, για μία ώρα και χρωματίστηκαν σε διάλυμα που περιείχε 0.25% χρωστική Coomassie brilliant blue σε 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, για ακόμη μία ώρα. Ο αποχρωματισμός των πηκτωμάτων έγινε με την έκθεσή τους σε διάλυμα αποχρωματισμού (50% μεθανόλη,

10% οξικό οξύ) για διάστημα μίας με τριών ωρών, μέχρι να επιτευχθεί το κατάλληλο υπόβαθρο χρωματισμού (background). Η διαδικασία αυτή επιταχύνεται με την προσθήκη χαρτομαντήλων (kimwipes) στο διάλυμα αποχρωματισμού. Για την απαραίτητη ενυδάτωση των πηκτωμάτων ακολούθησε η έκθεσή τους σε νερό. Τα πηκτώματα στην συνέχεια ξηράθηκαν υπό κενό και οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με έκθεση των πηκτωμάτων σε φίλμ Kodak Bio-max.

9. Ανάλυση πρωτεϊνών από παροδική επιμόλυνση σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα ακρυλαμιδίου**: 6,5% ακρυλαμίδιο, 3.5% NP-40, 57% ουρία, 4.8% αμφολύτης με πεδίο pH 5-8, 1.2% αμφολύτης με πεδίο pH 2.5-4, 1.2% αμφολύτης με πεδίο pH 4-6**

Διάλυμα επικάλυψης (overlay buffer): **28.5% ουρία, 1% NP-40, 2.5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 2.4% αμφολύτης με πεδίο pH 5-8, 0.6% αμφολύτης με πεδίο pH 2.5-4, 0.6% αμφολύτης με πεδίο pH 4-6**

Διάλυμα εξισσορόπησης: **0.0625 M Tris-HCl, (pH 6.8), 2% SDS, 10% γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη**

1% αγαρόζη: **1% αγαρόζη, 10% γλυκερόλη, 2.3% SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)**

Η τεχνική αυτή επιτρέπει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο με ισοηλεκτρική εστίαση και με βάση το μέγεθός τους, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολο που αναπτύχθηκε από τον O'Farrel (362), όπως ακριβώς έχει τροποποιηθεί από τον Zannis (355).

Για την ηλεκτροφόρηση με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα σωληνάρια μήκους 13 cm και διαμέτρου 3 mm. Για την παρασκευή των πηκτωμάτων, τα σωληνάρια καλύφθηκαν στην κάτω πλευρά με ταινία parafilm. Το εσωτερικό τους συμπληρώθηκε, μέχρι 2 cm από την κορυφή, με το διάλυμα ακρυλαμιδίου, χρησιμοποιώντας σύριγγα και αποφεύγοντας την δημιουργία φυσαλίδων. Μετά τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου (σε χρόνο λιγότερο μίας ώρας), αφαιρέθηκε η ταινία parafilm και τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στη ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης

Bio-rad (isoelectric focusing Bio-rad apparatus). Ο κάτω θάλαμος της συσκευής συμπληρώθηκε με 1.8 λίτρα από φωσφορικό οξύ 0.01 N και το δείγμα προς ανάλυση που είχε προηγουμένως διαλυθεί σε 50 μl αποδιατακτικού διαλύματος (όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στον τμήμα 7 των μεθόδων) φορτώθηκε στα σωληνάρια της ισοηλεκτρικής εστίασης. Στα υπό ανάλυση δείγματα επίσης φορτώθηκαν και μερικά μg (περίπου 5 μg) πρωτεΐνης αποA-I, που είχε απομονωθεί από το πλάσμα, με σκοπό την συγκριτική μελέτη των χαρακτηριστικών του φορτίου και του μεγέθους των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I του πλάσματος. Τα σωληνάρια ισοηλεκτρικής εστίασης στη συνέχεια συμπληρώθηκαν με το διάλυμα επικάλυψης (overlay buffer) και τέλος με μία-δύο σταγόνες από διάλυμα καυστικού νατρίου 0.01 N, που τοποθετήθηκε με προσοχή στην επιφάνεια χωρίς να προκληθεί ανάδευση του δείγματος που είχε προστεθεί. Τέλος ο πάνω θάλαμος της συσκευής ηλεκτροφόρησης συμπληρώθηκε με καυστικό νάτριο 0.01 N. Η ηλεκτροφόρηση έγινε για 2 ώρες με τάση 150 volts και 12-14 ώρες με τάση 500 volts. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα απομακρύνθηκαν από τα σωληνάρια σε κομμάτι ταινίας parafilm, με τη βοήθεια σύριγγας που συνδέεται με τμήμα λαστιχένιου σωληναρίου (rubber tubing). Η σύριγγα συνδέθηκε με το άκρο του κάθε σωληναρίου που έχει το πλέον όξινο pH, το σωληνάριο θερμάνθηκε υπό ρέον χλιαρό νερό, και η εξαγωγή του έγινε με εφαρμογή μικρής πίεσης μέσω της σύριγγας που περιείχε χλιαρό νερό. Τα επιμήκη κυλινδρικά πηκτώματα στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως για την ανάλυση στην δεύτερη διάσταση. Τα δείγματα που δεν ήταν δυνατόν να αναλυθούν αμέσως μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια falcon των 15-ml που περιείχαν διάλυμα εξισσορόπησης, εψήχθησαν σε μείγμα ξηρού πάγου/αιθανόλης και αποθηκεύθηκαν στους –70° C. Η αποθήκευση σε –70° C ήταν δυνατή για 3-4 μέρες, μέχρι την ανάλυσή τους στην δεύτερη διάσταση.

Η δεύτερη διάσταση διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος τους και έγινε σε κατακόρυφα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου (slab gels), παρουσία 1% SDS. Για την ανάλυση αυτή, τα κυλινδρικά πηκτώματα ξεπαγώθηκαν γρήγορα, τοποθετήθηκαν στην κορυφή κατακόρυφων πηκτωμάτων και ακινητοποιήθηκαν εκεί με την προσθήκη του διαλύματος 1% ζεστής αγαρόζης. Η ανάλυση του πηκτώματος έγινε όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά ανωτέρω για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (τμήμα 8 των μεθόδων).

10. Καθαρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I από το μέσο καλλιέργειας.

Για τον καθαρισμό των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I πραγματοποιήθηκε αρχικά συλλογή μέσου καλλιέργειας από τις κυλινδρικές φιάλες, σε συνολική ποσότητα ενός λίτρου. Το μέσο αυτό συγκεντρώθηκε σε τελικό όγκο 50 ml, με χρήση του Amicon ultrafiltration Cell (μοντέλο 8400, Amicon) με χρήση μεμβράνης με πόρους 10 KDa μοριακής μάζας (μοντέλο YM10, Amicon). Ακολούθησε διαπίδυση σε διάλυμα 0.01 M Tris (pH 8), με μεμβράνη με πόρους 12-14 KDa μοριακής μάζας και διήθηση σε φίλτρο (Nalgene, μέγεθος πόρου 0.2 μ), μετά την συμπύκνωση. Το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων υπεβλήθηκε σε κλασμάτωση με στήλη ανιονικής χρωματογραφίας (DEAE) (Pharmacia, Hi Trap Q), σε μηχάνημα FPLC. Η στήλη αυτή είχε προηγουμένως εξισσοροπηθεί με 25 ml (5 φορές τον όγκο της στήλης) διαλύματος 0.01 M Tris (pH 8). Το δείγμα φορτώθηκε στην στήλη με ρυθμό 0.4 ml/min και στο στάδιο αυτό συλλέχθηκαν κλάσματα των 9 ml. Η έκλουση των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με εφαρμογή κλιμακωτής διαβάθμισης (step gradient) διαλύματος NH_4CO_3, με συγκεντρώσεις 1M, 5%→20%→25→50%→100%, σε διάλυμα 0.01 M Tris (pH 8) και με ρυθμό έκλουσης 1 ml/min. Στο στάδιο αυτό η συλλογή των κλασμάτων έγινε σε όγκους των 3 ml. Τα διάφορα κλάσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδίου-παρουσία SDS (12%). Τα κλάσματα που περιείχαν την πλειονότητα της καθαρής μορφής της αποA-I ενώθηκαν και συγκεντρώθηκαν ξανά σε τελικό όγκο 2 ml, με χρήση του μικροσυγκεντρωτή centricon, με χρήση μεμβράνης που δεν είναι διαπερατή από μόρια με μοριακή μάζα <10 KDa (Amicon). Για το δεύτερο στάδιο καθαρισμού τα δείγματα υπεβλήθησαν σε κλασμάτωση με στήλη μοριακής διήθησης (gel filtration) (Hiprep Sephacryl S-200, Pharmacia). Η στήλη αυτή είχε εξισοροπηθεί προηγουμένως με διάλυμα 0.15 M NH_4CO_3, 0.02%_$NαN_3$, με 640 ml (δύο όγκοι στήλης) και με ρυθμό έκλουσης 0.63 ml/min. Το δείγμα τοποθετήθηκε στην στήλη με ρυθμό 0.1 ml/min και η στήλη εκλούθηκε με το προαναφερθέν διάλυμα με ρυθμό 0.63 ml/min, χρησιμοποιώντας όγκο διαλύματος ίσο με τον όγκο της στήλης (320 ml). Πραγματοποιήθηκε η συλλογή κλασμάτων όγκου 3 ml.

Η καθαρότητα του δείγματος σε αποA-I ελέχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-παρουσία SDS (12 %) και ακόλουθη χρώση του πηκτώματος με χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη αποA-I, σε βαθμό καθαρότητας μεγαλύτερο του 95%, χρησιμοποιήθηκαν για τις περαιτέρω μελέτες. Τα υπόλοιπα κλάσματα, συλλέχθηκαν και συγκεντρώθηκαν ξανά

σε τελικό όγκο 2 ml, με σκοπό το εκ νέου καθάρισμά τους από την στήλη μοριακής διήθησης.

Τα παρασκευάσματα της καθαρής αποA-I διαλύθηκαν σε διάλυμα ανθρακικού αμμωνίου (συνολική αλλαγή του διαλύματος 3 φορές, με χρήση μεμβράνης με πόρους μοριακής μάζας 12-14 KDa), για την απομάκρυνση της περίσσειας άλατος από το δείγμα. Ακολούθως τα δείγματα εψύχθησαν σε θερμοκρασία -80^{O} C, το υγρό απομακρύνθηκε με εξάχνωση σε λυοφιλοποιητή (Lyph Lock 6, Freeze dry system, Labconco) και αποθηκεύτηκαν σε -80^{O} C μέχρι την επόμενη χρήση τους.

Κάθε φορά πριν την χρήση τους οι πρωτεΐνες διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (τμήμα 13 των μεθόδων), ή διάλυμα χλωριούχου άλατος A (τμήμα 14 των μεθόδων) ανάλογα με την επακόλουθη μελέτη (παρασκευή σωματιδίων rHDL, αντίδραση ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT, πειράματα σύνδεσης ή συναγωνισμού με τον υποδοχέα SR-BI, σύνδεση με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων (DMPC), διασύνδεση με χρήση BS^3). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης καθορίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης της σε 280 nm, χρησιμοποιώντας τον γνωστό συντελεστή απορρόφησης (extinction coefficient) για την αποA-I (1.15 $mg^{-1}cm^2$), και με την μέθοδο Lowry.

11. Ανάλυση των πρωτεϊνών με μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσο-αποτύπωση (western blotting)

Τα κλάσματα του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I που χρησιμοποιήθηκαν για τις λειτουργικές μελέτες υπεβλήθησαν σε ανοσο-αποτύπωση. Για την σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μικρά ποσά από τις πρωτεΐνες (500 ng – 1 μg) και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-παρουσία SDS. Στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ακολουθήθηκε το πρωτόκολο που έχει περιγραφεί στο τμήμα 8 των μεθόδων (Ανάλυση των πρωτεϊνών των κυτταρικών γραμμών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS), μόνο που στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν μικρές κατακόρυφες συσκευές διαστάσεων 7.5 X 9.5 cm. Η ηλεκτροφόρηση έγινε υπό σταθερή τάση 100 Volts, για μία ώρα, σε διάλυμα 0.0125 M Tris, 0.01 M γλυκίνη**,** 0.0002 M SDS. Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, υπό τάση 50 Volts, σε διάλυμα 0.0125 M Tris, 0.01 M γλυκίνης, και 0.2%

μεθανόλης, για περίπου μία ώρα. Για την αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης πρωτεϊνών της μεμβράνης με τα αντισώματα (μπλοκάρισμα των μεμβρανών) έγινε επώαση των μεμβρανών με διάλυμα PBS που περιέχει 0.1% Tween-20 και 5% από μη λιπαρό ξηραμένο γάλα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση 3 φορές, για 5 λεπτά κάθε φορά, με διάλυμα PBS, 0.1% Tween-20 και 0.5% γάλατος και επώαση μίας ώρας με το ίδιο διάλυμα που περιείχε μονοκλωνικά αντισώματα για την ανθρώπινη αποA-I, σε διάλυση 1/2000 (χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα 5F-6, που ο επίτοπος του είναι τα αμινοξέα 118-141 της ανθρώπινης αποA-I). Στη συνέχεια οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 3 φορές, 15 λεπτά κάθε φορά, στο ίδιο διάλυμα που περιέχει το αντίσωμα για την IgG του ποντικού συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase), αραιωμένη σε 1/5000. Σε τελευταίο στάδιο έγινε έκπλυση 3 φορές, με τον προαναθερθέν τρόπο σε διάλυμα PBS, 0.1% Tween-20. Το αντιδραστήριο ενισχυμένου χημειοφθορισμού (ECL) παρέχει το υπόστρωμα για την υπεροξειδάση. Μετά από επώαση ενός λεπτού με ECL, η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με έκθεση των μεμβρανών σε φίλμ Kodak.

12. Μελέτες σύνδεσης της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC (Διμυστοϋλο-φωσφατιδυλο-χολίνη).

Η κινητική της σύνδεσης του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I σε πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC (multilamellar vesicles) μελετήθηκε με την θολωμετρική (turbidimetric) μέθοδο, όπως έχει περιγραφεί από τους Pownall et al (134). Το φωσφολιπίδιο DMPC διαλύθηκε σε απεσταγμένο διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (αναλογία όγκων 2:1) μέσα σε γυάλινο δοκιμαστικό σωληνάριο. Το δείγμα ξηράνθηκε υπό άζωτο, και ακολούθησε προσθήκη κατάλληλου ποσού από ένα διάλυμα 5 mg/ml της αποA-I σε διάλυμα 10 mM Tris-HCl (pH 8),150 mM NaCl, 1 mM NaN_3 και 0.01% EDTA. Η τελική αναλογία DMPC: αποA-I ήταν 2.5:1 (αναλογία κατά βάρος), και η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 0.2 mg/ml. Η κινητική της διαλυτοποίησης έγινε με καταγραφή των τιμών της απορρόφησης σε 325 nm ανά 5 λεπτά σε φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 3A, στους 24^{O} C.

13. Μελέτες διασύνδεσης μέσω του συνδέτη BS^3 (Δισ-σουλφο-σουξινιμυδυλο-σουβερικό)

Οι συγκεντρώσεις της αποA-I που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της διασύνδεσης (cross-linking) μορίων της αποA-I που υπάρχουν σε δισκοειδή σωματίδια ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) ήταν 0.5-1.2 mg/ml. Όταν χρησιμοποιήθηκε ελεύθερη λιπιδίων αποA-I η συγκέντρωση ήταν 1.2-2 mg/ml. Το δείγμα της αποA-I διαλύθηκε σε φωσφορικό διάλυμα (0.02 M φωσφορικό νάτριο, 0.9% NaCl, 0.01% EDTA, 0.02% NaN_3, pH 7.4). Μια μικρή ποσότητα (100 μl) από κάθε δείγμα, που φέρει την ανωτέρω συγκέντρωση, μεταφέρθηκε σε πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάρια eppendorf. Ακολούθησε προσθήκη 50 μl διαλύματος BS^3 10 mM, ισχυρή ανάδευση (vortex) του μείγματος και επώαση σε 4^O C, για 3.5 ώρες, έχοντας ελαφρώς κλειστά τα σωληνάρια eppendorf. Στο τέλος του χρόνου επώασης, η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 10 μl διάλυματος εθανολαμίνης (250 mM), που δρα ως αποσβέστης της αντίδρασης διασύνδεσης (quencher). Το διάλυμα ακολούθως συγκεντρώθηκε στο 1/4 του αρχικού του όγκου, με αντλία κενού (Speed-vac), ή με χρήση συγκεντρωτών microcon, που είχαν μεμβράνες μοριακής μάζας 10 KDa (Amicon). Το συμπυκνωμένο δείγμα αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου διαβάθμισης 8-25%, στη συσκευή της Pharmacia Phast gel, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS), με ηλεκτροφόρηση στα 76 volts.

14. Παρασκευή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL)

Τα σωματίδια της ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) παρασκευάσθηκαν με βάση την μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου (sodium cholate dialysis method), με μερικές μικρές τροποποιήσεις (139). Η μοριακή αναλογία στα σωματίδια rHDL ήταν 100:10:1:100 (POPC: χοληστερόλη: A-I: χολικό νάτριο). Σε ένα τυπικό πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν 0.14 γραμμάρια χοληστερόλης (μη-ραδιοσημασμένη, ή σημασμένη με ^{14}C-χοληστερόλη, σε αναλογία 5.000-7.000 κρούσεις ανά nmole μη-σημασμένης χοληστερόλης) και 2.71 γραμμάρια POPC, τα οποία αναμείχθηκαν σε γυάλινο σωληνάριο με ήπια ανάδευση και ακολούθως ξηράνθηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Τα ξηραμένα λιπίδια επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM NaN_3, 0.01% EDTA), με συνεχή ισχυρή ανάδευση (vortex) για περίπου 30 δευτερόλεπτα και ακολούθησε επώαση σε πάγο για συνολικό διάστημα μιας ώρας. Στη συνέχεια προσετέθη διάλυμα χολικού νατρίου και το μείγμα επωάσθηκε μια ώρα σε

πάγο. Σε τελικό στάδιο έγινε η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας της αποA-I και η επώαση συνεχίστηκε για μια ακόμη ώρα. Για την απομάκρυνση του χολικού νατρίου τα δείγματα διαλύθηκαν σε 5-6 λίτρα διάλυματος Α, στους 4^{O} C, με χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν την έξοδο μορίων μοριακής μάζας <12-14 KDa. Για την απομάκρυνση της ελεύθερης αποA-I, που δεν έχει ενσωματωθεί στα σωματίδια, ακολούθησε επιπλέον διαπίδυση σε διάλυμα Α με μεμβράνη διαπίδυσης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν την έξοδο μορίων μοριακής μάζας <50 kDa ή κλασμάτωση σε στήλη χρωματογραφίας (FPLC). Για την εν λόγω κλασμάτωση χρησιμοποιήθηκε στήλη σουπερόζης (Superose 6HR, 10/30) της Pharmacia, με όγκο πορώδους υλικού (bed volume) 24 ml. Η στήλη εξισορροπήθηκε αρχικά με διάλυμα Α. Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν σε τελικό όγκο 200μl, φορτώθηκαν στη στήλη με ρυθμό 0.4 ml/min και εκλούθηκαν με διάλυμα Α, με τον ίδιο ρυθμό. Συλλέχθηκαν κλάσματα των 0.5 ml και τα σωματίδια rHDL συνήθως εκλούονταν στα κλάσματα 9-14. Για την ανάλυση των σωματιδίων των κλασμάτων χρωματογραφίας πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε διαβάθμιση 8-25% πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, σε 15^{O} C, με το σύστημα της Pharmacia Phast gel. Τα σωματίδια αποθηκεύθηκαν στους 4^{O} C υπό N_2 (άζωτο) για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπιδίων.

15. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Τα σωματίδια rHDL που παρασκευάστηκαν με τις διάφορες μορφές της αποA-I, μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το κάθε δείγμα μελετήθηκε χωρίς διάλυση. Σε ορισμένα πειράματα συγκεντρωμένα δείγματα αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml, με απεσταγμένο νερό. Ένα δείγμα 5 μl από κάθε διάλυμα σωματιδίων εφαρμόστηκε για 10 δευτερόλεπτα σε καλυπτρίδα με επικάλυψη άνθρακα (a Formvar carbon-coated 300 mesh copper grid). Η επιφάνεια της καλυπτρίδας είχε προηγουμένως καθιστεί υδρόφιλη με αποφόρτιση (glow discharging) σε συσκευή Balzers Union CTA 010 Glow Discharge. Το επιπλέον δείγμα των σωματιδίων απορροφήθηκε (blotting with filter paper) και η καλυπτρίδα επωάσθηκε με 5 ml διαλύματος 1% φωσφοτουνκστενικού καλίου (potassium phosphotungstate) (pH 7.4). Μετά από μερικά λεπτά η καλυπτρίδα απεμακρύνθηκε από το διάλυμα, αφαιρέθηκε η περίσσεια χρωστικής και ξηράνθηκε υπό αέρα. Περιοχές των σωματιδίων υπό την καλυπτρίδα φωτογραφήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Philips CM12 (Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands).

16. Μελέτες ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT

Ο στόχος αυτού του πειράματος ήταν να καθοριστεί η ικανότητα των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I σε σωματίδια rHDL να ενεργοποιήσουν το ένζυμο LCAT. Για την ανάλυση αυτή, το υπόστρωμα rHDL διαλύθηκε σε διάλυμα A (10 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM NaN_3, 0.01% EDTA), για να δώσει τις κατάλληλες συγκεντρώσεις για το πείραμα. Κάθε πείραμα έγινε με 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, που περιέχουν 10^{-7} εως 10^{-6} M της αποA-I. Η χαμηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος περιείχε τουλάχιστον 5.000 κρούσεις ^{14}C-χοληστερόλης. Τα σωματίδια rHDL προστέθηκαν σε γυάλινο σωληνάριο μαζί με 50 μl από διάλυμα 40 mg/ml BSA, και 20 μl από διάλυμα 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλης. Το μείγμα αναμείχθηκε ισχυρά (vortex) και επωάσθηκε στους 37^{O} C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε το ένζυμο, (10 μl διαλύματος καθαρού ενζύμου LCAT συγκέντρωσης 280 μg/ml), και η επώαση συνεχίστηκε για επιπλέον 30 λεπτά. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 5 ml διαλύματος ολεϊκού εστέρα χοληστερόλης: χοληστερόλης (40 ng/ml από το καθένα) σε χλωροφόρμιο:μεθανόλη (αναλογία όγκων 2:1). Το μείγμα αναμείχθηκε ισχυρά (vortex) και μεταφέρθηκε στους 4^{O} C για τουλάχιστον 40 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν η οργανική από την ανόργανη φάση. Η επάνω, υδατική φάση απομακρύνθηκε με πιπέτα παστέρ, και η κάτω, οργανική φάση, ξηράνθηκε υπό άζωτο. Τα λιπίδια επαναδιαλύθηκαν σε 500 μl χλωροφορμίου, αναμείχθηκαν ισχυρά με vortex και αμέσως ξηράνθηκαν υπό άζωτο. Το υπόλλειμα επαναδιαλύθηκε σε 75 μl χλωροφορμίου και τοποθετήθηκε σε χρωματογραφική πλάκα ITLC (Gelman Sciences). Η πλάκα αυτή αναπτύχθηκε για περίπου 90 δευτερόλεπτα, σε διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα: εθύλ-αιθέρα: οξικού οξέος (αναλογία όγκων 85:15:1) και μετά ξηράνθηκε στην απαγωγό εστία με ήπιο ρεύμα αέρος. Οι ζώνες των εστέρων χοληστερόλης και της ελεύθερης χοληστερόλης εμφανίστηκαν με έκθεση σε ατμούς ιωδίου (iodine vapors), για 10-20 δευτερόλεπτα, σε χρωματογραφικό θάλαμο. Οι θέσεις της ελεύθερης χοληστερόλης και των εστέρων χοληστερόλης σημειώθηκαν απευθείας με μολύβι και το κίτρινα χρωματισμένο ιώδιο αφέθηκε να εξαχνωθεί, μέχρι την πλήρη εξαφάνιση της χρώσης. Τότε οι ζώνες της ελεύθερης χοληστερόλης και των εστέρων χοληστερόλης κόπηκαν χωριστά και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες σπινθηρισμού. Ακολούθησε προσθήκη 10 ml διαλύματος σπινθηρισμού και επώαση 30 λεπτών ώστε να έχει επιτευχθεί η πλήρης αποσύνδεση των λιπιδίων από την χρωματογραφική πλάκα. Τελικά όλα τα δείγματα μετρήθηκαν σε μετρητή σπινθηρισμού LKB (LKB Scintillation counter).

17. Πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος (pulse-chase)

Τα πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγθεί η κινητική και η σταθερότητα της έκκρισης του φυσικού τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I. Οι μόνιμα μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές C127 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 35 mm μέχρι να φθάσουν σε 95% βαθμό ανάπτυξης (confluency), σε θρεπτικό μέσο DMEM που περιέχει 10% ορό εμβρύου μόσχου, πενικιλλίνη, στρεπτομυκίνη (100 μονάδες/ml), 10 μM $CdCl_2$ και 2 mM γλουταμίνη. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τόσα τρυβλία όσα είναι τα χρονικά σημεία (time points) που ενδιαφερόμαστε να μελετήσουμε (στην περίπτωσή μας επιλέχθηκαν οι χρόνοι 0, 10, 20, 30, 50, 80, 120, 150 λεπτά και χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 8 τρυβλία).

Τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε πλύση δύο φορές με 2 ml από θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε μεθειονίνη και ορό (περιείχε όμως κάδμιο και γλουταμίνη) και επωάσθηκαν για μία με μίαμιση ώρα στους 37° C με το ίδιο θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια υπεβλήθησαν σε πλύση δύο φορές με το ίδιο θρεπτικό μέσο και τελικώς επωάσθηκαν με 1 ml από το μέσο μαζί με 0.25 μCi ^{35}S μεθειονίνη για 30 λεπτά (διαδικασία ραδιοσήμανσης-pulse). Το τέλος του χρόνου αυτού ελήφθη ως ο χρόνος 0 για το πείραμα. Σε αυτό το σημείο όλα τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε πλύση δύο φορές με το ίδιο θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια επωάσθηκαν με θρεπτικό μέσο DMEM (παρουσία πενικιλλίνης, στρεπτομυκίνης, χλωριούχου καδμίου, γλουταμίνης και 10 mM μη-σημασμένης μεθειονίνης). Η απομάκρυνση του ραδιενεργού αμινοξέος (chase) έγινε για κάθε τρυβλίο για χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί στα επιλεγόμενα χρονικά σημεία του πειράματος. Για το κάθε χρονικό σημείο ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά έγινε συλλογή και αποθήκευση του μέσου καλλιέργειας, που περιέχει όλες τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες και ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με διάλυμα PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάσθηκαν με 1 ml διαλύματος λύσης χωρίς SDS (Lysis mix-SDS) και συλλέχθηκε το κυτταρικό λύμα, που περιείχε τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση των συλλεχθέντων μέσων καλλιέργειας και των κυτταρικών λυμάτων, όπως έχει προαναφερθεί (τμήμα 7 των μεθόδων) και ανάλυσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδίου, παρουσία SDS και επακόλουθη αυτοραδιογραφία.

18. Πειράματα σύνδεσης με τον υποδοχέα SR-BI

Α) Κυτταρική καλλιέργεια

Η κυτταρική σειρά ldlA-7 είναι μια κυτταρική σειρά, που προέρχεται από κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ (Chinese hamster ovary, CHO) και έχει μεταλλαχθεί ώστε να μην παράγει λειτουργικό υποδοχέα της LDL. Η κυτταρική αυτή σειρά εκφράζει πολύ μικρά ποσά υποδοχέα SR-BI, και χαρακτηρίζεται από μειωμένη ικανότητα σύνδεσης HDL και επιλεκτικής πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης της HDL (118, 278). Τα κύτταρα ldlA-7 διατηρούνται σε μονοστοιβάδα με θρεπτικό μέσο Ham's F12, που περιέχει 5% ορό εμβρύου μόσχου, 100 μονάδες/ml πενικιλλίνη, 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM γλουταμίνη (θρεπτικό μέσο Α).

Τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] είναι κύτταρα ldlA-7 μόνιμα μετασχηματισμένα με το cDNA του υποδοχέα SR-BI του ποντικού (118). Τα κύτταρα αυτά διατηρούνται ως μονοστοιβάδα σε θρεπτικό μέσο Β (θρεπτικό μέσο Α, που περιέχει επιπλέον 500 μg/ml G418). Όλες οι επωάσεις έγιναν σε θερμοκρασία 37° C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2. Η επώαση κυττάρων ldlA[mSR-BI] με αντίσωμα για την καρβοξυτελική περιοχή του SR-BI αναστέλλει την σύνδεση της HDL στα κύτταρα..

Β) Απομόνωση λιποπρωτεϊνών, ραδιοσήμανση, και χαρακτηρισμός

Το αίμα προήλθε από υγιείς ανθρώπινους δότες μετά από νηστεία. Για το κάθε παρασκεύασμα χρησιμοποιήθηκε πλάσμα από δύο δότες (συνολικά 500 ml αίματος). Η απομόνωση της σφαιρικής HDL έγινε με φυγοκέντρηση ζώνης, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως από τους Batsch et al (363). Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου, στους 4° C, για την αποφυγή της οξείδωσης, μέχρι την χρήση τους.

Η ραδιοσήμανση των πρωτεϊνών HDL και αποA-I με ραδιενεργό ιώδιο (^{125}I) έγινε με χρήση της μεθόδου του μονοχλωρικού ιωδίου, όπως έχει περιγραφεί από τους Goldstein et al. (364). Τα κλάσματα της HDL που χρησιμοποιήθηκαν για ραδιοσήμανση και στη συνέχεια στα πειράματα συναγωνισμού είχαν πυκνότητα που κυμαίνεται μεταξύ 1.1-1.14 gr/ml. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης των παρασκευασμάτων της HDL, των απολιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών λυμάτων προσδιορίσθηκε με την μέθοδο Lowry (365).

Η μελέτη της σύστασης σε απολιποπρωτεΐνες των παρασκευασμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου με διαβάθμιση 6-20%, παρουσία

SDS, και χρώση με Coomassie brilliant blue. Όλα τα παρασκευάσματα (μη-ραδιοσημασμένες και ^{125}I-σημασμένες) της HDL υπεβλήθησαν παροδικά σε έλεγχο, και τα παρασκευάσματα που εμφάνιζαν ανώμαλη ηλεκτροφορητική συμπεριφορά, που πιθανώς οφειλόταν σε οξείδωση, δεν χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω πειράματα.

Γ) Πειράματα κυτταρικής σύνδεσης και πειράματα συναγωνισμού με χρήση ραδιοσημασμένων συνδετών

Η μελέτη της σύνδεσης των διαφόρων υποστρωμάτων στον υποδοχέα SR-BI στους 37° C έγινε με την μέτρηση της κυτταρικής σύνδεσης ραδιοσημασμένων συνδετών, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (21, 118, 292, 366, 367). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: την ημέρα 0 τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων (διαμέτρου 15 mm), σε αριθμό κυττάρων 4.5-5x10^4 ανά θέση. Τα κύτταρα ldlA-7 επωάσθηκαν με θρεπτικό μέσο Α και τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] με θρεπτικό μέσο Β. Την ημέρα 2 οι μονοστοιβάδες υπεβλήθησαν σε πλύση δύο φορές με θρεπτικό μέσο Ham's F12 και στην συνέχεια προσετέθησαν 0.4-0.5 ml από θρεπτικό μέσο Γ (Ham's F-12 που περιείχε 0.5% (αναλογία βάρους/όγκο) FAF-BSA, 100 μονάδες/ml πενικιλλίνη, 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM γλουταμίνη). Στο μείγμα αυτό προστέθηκαν και οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες-συνδέτες (όπως ^{125}I-HDL και ελεύθερη λιπιδίων ^{125}I-αποA-I, ή δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν αποA-I (rHDL{αποA-I}), απουσία ή παρουσία μη ραδιοσημασμένων συναγωνιστών. Πιο αναλυτικά, στα πειράματα άμεσης κυτταρικής σύνδεσης, που προοριζόταν για την λήψη καμπύλων κορεσμού, οι επωάσεις έγιναν με απουσία ή παρουσία μη ραδιοσημασμένης HDL, 40 φορές πολλαπλάσια της πρωτεϊνικής μάζας (40-fold protein mass excess of unlabeled HDL). Οι μετρήσεις απουσία της HDL έγιναν εις διπλούν, με σκοπό τον καθορισμό της ολικής σύνδεσης (ειδικής και μη ειδικής), ενώ η μέτρηση παρουσία της HDL έγινε σε ένα δείγμα και ελήφθη η τιμή της μη-ειδικής κυτταρικής σύνδεσης. Για τα πειράματα συναγωνισμού έγιναν διπλές μετρήσεις παρουσία ή απουσία των μη ραδιοσημασμένων συναγωνιστών.

Μετά από επώαση για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία 37° C, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε 4° C και υπεβλήθησαν σε πλύση εις διπλούν με διάλυμα Β (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl) που περιείχε επίσης 2 mg/ml FAF-BSA, και ακολούθως μία ακόμη φορά με διάλυμα Β. Τα κύτταρα στην συνέχεια διαλύθηκαν σε 500 μl διαλύματος καυστικού νατρίου (κανονικότητας 0.1) και οι μετρήσεις της ραδιενέργειας και της συγκέντρωσης πρωτεΐνης έγιναν όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (118, 292, 366).

Δ) Πειράματα κυτταρικής σύνδεσης με χρήση μη ραδιοσημασμένων συνδετών-Τεχνική ανοσο-υποδοχέα (Immunoreceptor assay)

Για την μελέτη της κυτταρικής σύνδεσης με τους μη-σημασμένους συνδέτες χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη πειραματική προσέγγιση: την ημέρα 0 του πειράματος κύτταρα ldlA-7 και ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 6-θέσεων (διαμέτρου 30 mm) σε αριθμό $3x10^5$ κύτταρων ανά θέση σε θρεπτικό μέσο Α (ldlA-7) ή θρεπτικό μέσο Β (ldlA[mSR-BI]). Την ημέρα 2 του πειράματος, οι μονοστοιβάδες υπεβλήθησαν σε πλύση εις διπλούν με Ham's F12 θρεπτικό μέσο (ή διάλυμα PBS) και μετά επωάσθηκαν με 0.7-1 ml από το μέσο Γ (Ham's F12, 0.5% (αναλογία βάρους/όγκο) ελεύθερη λιπιδίων αλβουμίνη ορού μόσχου (FAF-BSA), 100 μονάδες/ml πενικιλλίνη, 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη, 2 mM γλουταμίνη) με τα αντίστοιχα ποσά της μη ραδιοσημασμένων συνδετών (π. χ. ελεύθερη λιπιδίων αποA-I, rHDL{αποA-I}, σφαιρική HDL). Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εις διπλούν των δειγμάτων σε κάθε τιμή συγκέντρωσης. Μετά από επώαση μιάμισης ώρας σε 37° C, τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε πλύση εις διπλούν στους 4° C με το διάλυμα Β (0.05 M Tris-HCl (pH 7.4), 1M NaCl) που περιείχε 2 mg/ml FAF-BSA, και ακολούθησε μια πλύση με διάλυμα Β. Τα κύτταρα διαλύθηκαν σε διάλυμα λύσης (lysis buffer : PBS, 1% Triton X-100, 50 μg/ml PMSF, 1 μg/ml πεπστατίνη, 20 μg/ml απρωτινίνη και 10 μg/ml λευπεπτίνη) και επωάσθηκαν, με ανάδευση (shaking) στους 4° C, για 30 λεπτά. Τα συλλεχθέντα λύματα υπεβλήθησαν σε φυγοκέντρηση σε 14.000 σ.α.λ., σε φυγόκεντρο Beckman για 20 λεπτά, στους 4° C, και τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε καθαρούς σωλήνες eppendorf. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση των κυτταρικών λυμάτων καθορίστηκε με την μέθοδο των Lowry et al (365).

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα 20-30 μg από το κάθε κυτταρικό λύμα για την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (12%). Για την δημιουργία των γραφικών παραστάσεων αναφοράς (standard curves) έγινε ανάλυση της ίδιας πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στο αντίστοιχο πείραμα σύνδεσης. Συγκεκριμένα, ποσότητες της πρωτεΐνης-συνδέτη που κυμαίνονται από 1 έως 25 ng αναμείχθηκαν με το ίδιο ποσό κυτταρικού λύματος (20-30 μg) που προήλθε

από κύτταρα (που δεν έχουν επωαστεί με την πρωτεΐνη) και αναλύθηκαν σε ανεξάρτητες σειρές στο ίδιο πήκτωμα. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε χρωματισμένος δείκτης πρωτεϊνών με γνωστή μοριακή μάζα (Rainbow Molecular Weight Marker, Pharmacia) που επιτρέπει την παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος έγινε υπό σταθερή ένταση 50 mA, σε διάλυμα 0.0125 M Tris, 0.01 M γλυκίνη, 0.0002 M SDS για 4-5 ώρες.

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF, υπό τάση 50 Volts, σε διάλυμα 500 mM CAPs-NaOH (pH 11.5), για περίπου μία ώρα. Η παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης πρωτεϊνών της μεμβράνης με τα αντισώματα, (blocking) έγινε με επώαση των μεμβρανών με διάλυμα PBS που περιείχε 0.1% Tween-20 και 5% από μη λιπαρό ξηραμένο γάλα (nonfat dried milk), σε θερμοκρασία δωματίου για μιάμιση ώρα ή ολονύκτια επώαση σε 4° C. Ακολούθως οι μεμβράνες υπεβλήθησαν σε πλύση 3 φορές, για 15 λεπτά κάθε φορά, με διάλυμα PBS, 0.1% Tween-20 και 0.5% μη λιπαρό ξηραμένο γάλα και μετά επωάσθηκαν για μία ώρα με το ίδιο διάλυμα που περιέχει μονοκλωνικά αντισώματα για την ανθρώπινη αποA-I, σε διάλυση 1/2000 (χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα 5F-6, που ο επίτοπός του είναι τα αμινοξέα 118-141 της ανθρώπινης πρωτεΐνης αποA-I). Στη συνέχεια οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 3 φορές, 15 λεπτά κάθε φορά, με PBS, 0.1% Tween-20 και τελικώς επωάσθηκαν με το ίδιο διάλυμα που περιέχει το αντίσωμα για την IgG του ποντικού συνδεδεμένη με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase), σε διάλυση 1/5000. Σε τελευταίο στάδιο έγινε έκπλυση της μεμβράνης 3 φορές, με τον προαναθερθέν τρόπο. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν συνδεθεί με το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο ενισχυμένου χημειοφθορισμού που περιέχει το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης. Οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματίστηκαν μαύρες και ανιχνεύθηκαν με έκθεση των μεμβρανών σε φίλμ Kodak (Kodak Digital Science Image Station 440CF), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσοτικοποίηση της έντασης της κάθε ζώνης έγινε με την χρήση του προγράμματος Image Quant και περιγράφεται αναλυτικά στα αποτελέσματα. Ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων, φαινομενικού Kd (Kd_{app}) και φαινομενικού Bmax ($Bmax_{app}$) έγινε με την

χρήση του προγράμματος Prism και επίσης περιγράφεται στα αποτελέσματα.

19. Πλασμιδιακές κατασκευές

Ο πολλαπλασιασμός του DNA και οι πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στα αποτελέσματα.

1. Πλασμίδια-Φορείς

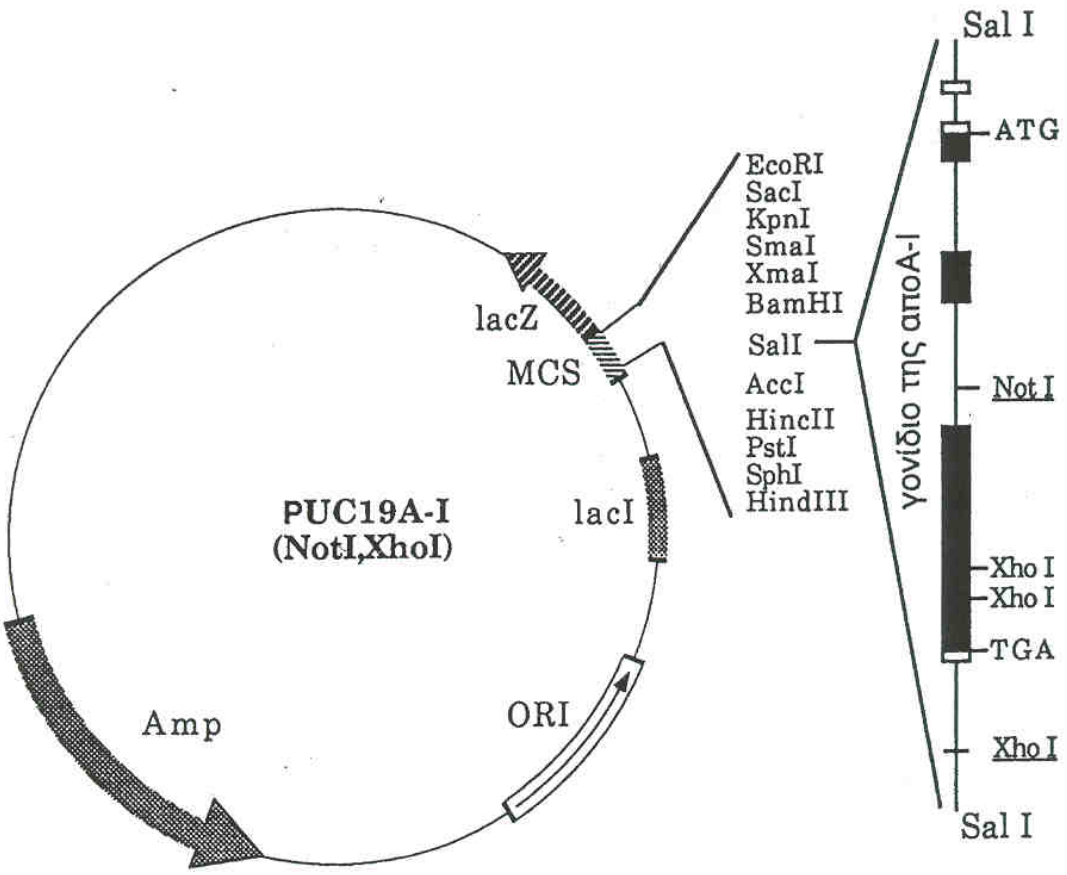
A. PUC19, PUC19A-I, PUC19A-I (NotI, XhoI)

Το πλασμίδιο PUC19 αποτελεί ένα μικρό φορέα κλωνοποίησης για μεγάλο αριθμό αντιγράφων και προέρχεται από το *Escherichia coli.* Έχει μέγεθος 2.686 bp και είναι εξαιρετικά χρήσιμο για την κλωνοποίηση ξένων γονιδίων. Περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη, το οποίο προέρχεται από το πλασμίδιο pBR322. Επίσης περιέχει περιοχή έναρξης της αντιγραφής μαζί με ένα κομμάτι του γονιδίου της γαλακτοσιδάσης του *E. coli* (*lacZ*), που φέρει πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (MCS-multiple cloning site). Το πλασμίδιο προμηθεύεται από την New England Biolabs (αριθμός καταλόγου #304-1S).

Για την δημιουργία του πλασμιδίου PUC19A-I, ο φορέας PUC19 κόπηκε με το περιοριστικό ένζυμο SalI, επεξεργάστηκε με βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση και ενώθηκε με το ανθρώπινο γονίδιο της αποA-I. Το γονίδιο της αποA-I αποτελείται από 2.2 κιλοβάσεις και περιλαμβάνει 270 νουκλεοτίδια πριν από το πρώτο νουκλεοτίδιο έναρξης της αποA-I και 950 βάσεις μετά την θέση πολυαδενυλίωσης. Για την κλωνοποίηση στον φορέα PUC19, το τμήμα PstI-PstI του γονιδίου της αποA-I ενώθηκε με SalI συνδέτες και εισήχθη στην θέση SalI του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου PUC19. Το πλασμίδιο PUC19A-I παρέχεται από τον Roghani (368).

Ο φορέας PUC19A-I τροποποιήθηκε ώστε να περιέχει δύο νέες θέσεις πέψης από περιοριστικά ένζυμα στο τρίτο ιντρόνιο και στο 3΄-άκρο του γονιδίου της αποA-I. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές πολλαπλασιασμού του DNA με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), που φέρουν τις επιθυμητές αλληλουχίες για την εισαγωγή μιας νέας θέσης πέψης από το περιοριστικό ένζυμο NotI στις θέσεις 1136-1143, μετά την θέση πέψης SacII στο τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου της αποA-I, και ακόμη μιας θέσης για πέψη από το ένζυμο XhoI στις θέσεις 287-293 της ενδογονιδιακής αλληλουχίας μεταξύ των γονιδίων αποA-I και αποC-III πριν από την θέση του πολυσυνδέτη. Οι αριθμοί αναφέρονται στην αλληλουχία του γονιδίου της αποA-I, που δίνεται από τους Karathanasis et al (40).

ΕΙΚΟΝΑ 18. Σχηματική παράσταση του πλασμιδίου φορέα PUC19A-I (NotI,XhoI). Ο φορέας περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη (amp), καθώς και πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (MCS), η οποία βρίσκεται στην περιοχή του γονιδίου της γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Στην SalI θέση του πολυσυνδέτη έχει κλωνοποηθεί το ανθρώπινο γονίδιο της αποA-I, το οποίο φέρει τις θέσεις αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα NotI και XhoI (οι θέσεις έχουν υπογραμμιστεί στο σχήμα) (368).

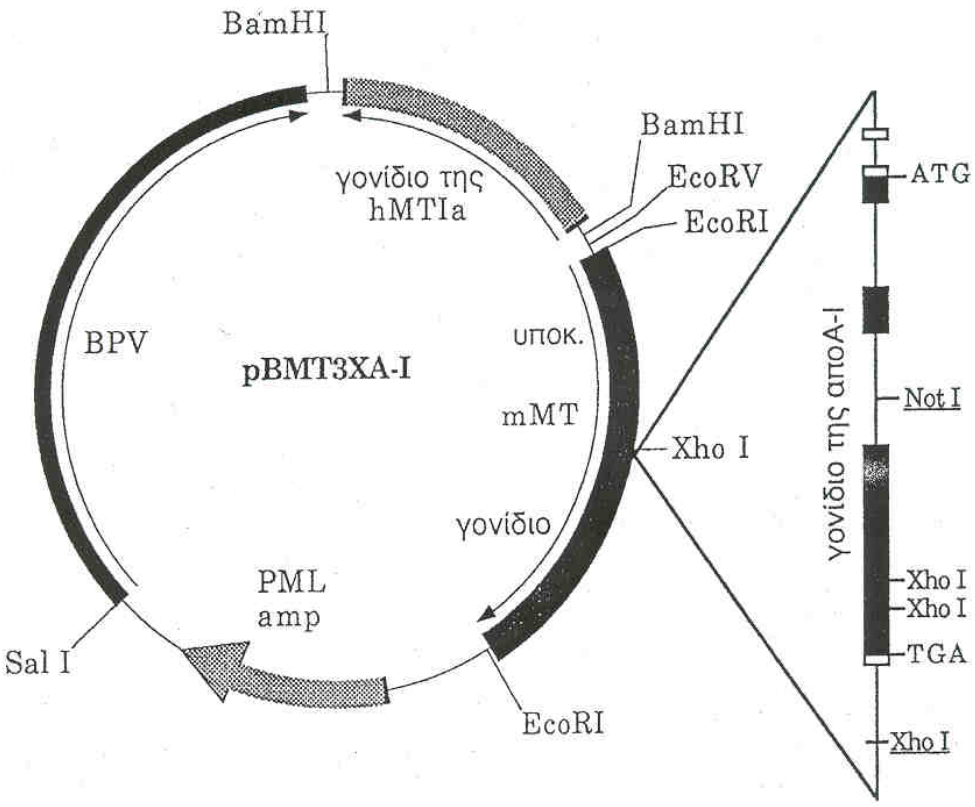

PUC19A-I
(NotI,XhoI)
lacZ
MCS
lacI
ORI
Amp
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
XmaI
BamHI
SalI
AccI
HincII
PstI
SphI
HindIII
γονίδιο της αποA-I
Sal I
ATG
Not I
Xho I
Xho I
TGA
Xho I
Sal I

Β. PBMT3X, PBMT3XA-I

Το πλασμίδιο PBMT3X είναι ένας φορέας που περιέχει σχεδόν όλο το γονιδίωμα του ιού βοΐου θηλώματος (Bovine Papilloma Virus, BPV), καθώς και αλληλουχίες pML που είναι απαραίτητες για μετασχηματισμό και αντιγραφή σε βακτηριακά κύτταρα. Το πλασμίδιο pML είναι ένα κομμάτι του πλασμιδίου pBR322. Ο φορέας επίσης περιέχει το ανθρώπινο γονίδιο της μεταλλοθειονίνης (hMTIa), που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης επιλογής γιατί δίνει στα κύτταρα που το προσέλαβαν ανθεκτικότητα σε αυξημένα επίπεδα βαριών μετάλλων, όπως καδμίου. Στον φορέα αυτό υπάρχει και το γονίδιο της μεταλλοθειονίνης του ποντικού (mMT) στο οποίο δημιουργήθηκε μια θέση πέψης από το περιοριστικό ένζυμο XhoI πριν από το κωδικόνιο έναρξης για το γονίδιο της μεταλλοθειονίνης του ποντικού. Έτσι γονίδια που περιέχουν όλη την κωδική αλληλουχία μπορούν να κλωνοποιηθούν στην μοναδική XhoI θέση που βρίσκεται 92 βάσεις πριν από την αλληλουχία TATA του υποκινητή του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης του ποντικού και βρίσκονται υπό τον έλεγχό του. Ο φορέας επίσης περιέχει θέσεις πολυαδενυλίωσης του ιού SV40 και σήματα για εκτομή εξονίων (splicing). Ο φορέας έχει περιγραφεί από τους Cladaras et al (369).

Ο φορέας PBMT3XA-I είναι το πλασμίδιο PBMT3X με κλωνοποιημένο το γονίδιο της αποA-I. Συγκεκριμένα η SalI-SalI περιοχή του γονιδίου αποA-I (μεγέθους περίπου 2.2 κιλοβάσεων) εκόπη από το πλασμίδιο PUC19A-I και κλωνοποιήθηκε στην μοναδική XhoI θέση. Με αυτό τον τρόπο η έκφραση του γονιδίου της αποA-I τοποθετήθηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης του ποντικού. Είναι προφανές ότι το πλασμίδιο PBMT3XA-I περιέχει τις θέσεις πέψης από τα περιοριστικά ένζυμα NotI και XhoI στις αντίστοιχες θέσεις της αλληλουχίας της αποA-I που έχουν περιγραφεί και για τον τροποποιημένο φορέα PUC19A-I (NotI, XhoI) (Εικόνα 18).

ΕΙΚΟΝΑ 19. Σχηματική παράσταση του τελικού φορέα έκφρασης PBMT3XA-I. Ο φορέας βασίζεται στο γονιδίωμα του ϊού βοίου θηλώματος (Bovine Papilloma Virus,BPV) και φέρει τα γονίδια της μεταλλοθειονίνης του ανθρώπου (hMTIa) και του ποντικού (mMT), καθώς και αλληλουχίες pML που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη. Στην XhoI θέση πριν από τον υποκινητή του γονιδίου της mMT έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο της αποA-I, που έχει τροποποιηθεί ώστε να φέρει τις θέσεις αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα NotI και XhoI που έχουν υπογραμμιστεί στο σχήμα.


BamHI
γονίδιο της hMTIa
BamHI
EcoRV
EcoRI
BPV
pBMT3XA-I
υποκ.
mMT
Xho I
γονίδιο
PML
amp
Sal I
EcoRI
γονίδιο της αποA-I
ATG
Not I
Xho I
Xho I
TGA
Xho I

2. Πολλαπλασιασμός του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR) και δημιουργία των μεταλλάξεων του γονιδίου της αποA-I στον φορέα PUC19A-I (NotI, XhoI)

Η μεταλλαξιγένεση σε μια διπλή έλικα DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές. Η μεταλλαξιγένεση με PCR είναι γρήγορη και αποτελεσματική, όμως υπάρχει η πιθανότητα εισαγωγής λάθους στην πολλαπλασιαζόμενη αλληλουχία. Η πιθανότητα αυτή μειώνεται με τη χρήση του θερμοσταθερού ενζύμου Vent DNA πολυμεράση που έχει και ικανότητα επιδιόρθωσης των λαθών που δημιουργούνται κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA.

Οι μεταλλάξεις που έγιναν στο γονίδιο της αποA-I βασίστηκαν στο μοντέλο της δευτεροταγούς δομής, που έχει προταθεί από τους Nolte και Atkinson (Εικόνα 8), (61), και είναι οι εξής

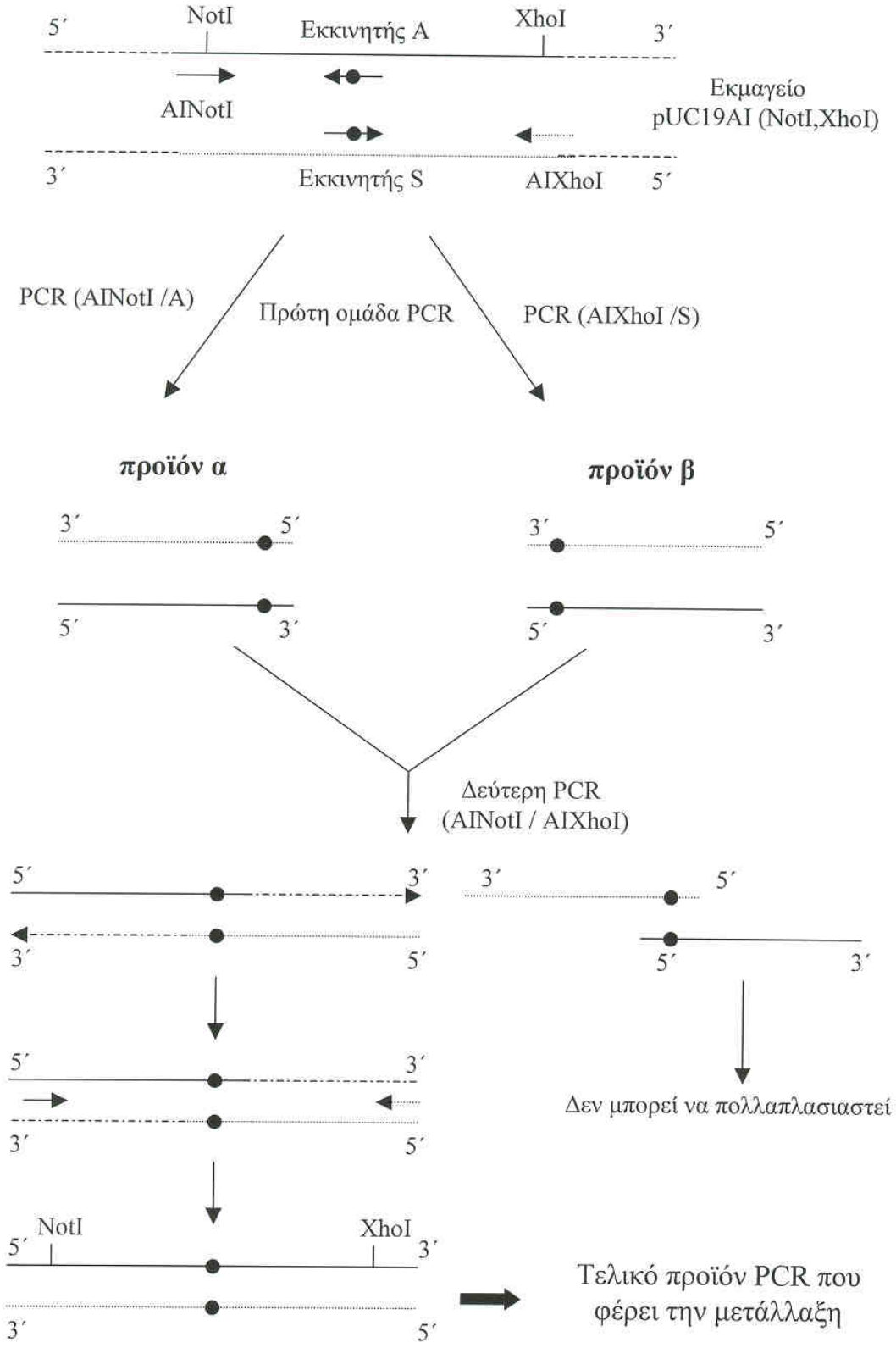
1) απαλοιφή των ελίκων 7-10, με εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στο αμινοξύ προλίνη στη θέση 165
2) απαλοιφή μέρους της έλικας 7 και των ελίκων 8-10, με εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στο αμινοξύ αλανίνη στη θέση 175
3) απαλοιφή των ελίκων 8-10, με εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στο αμινοξύ γλυκίνη στη θέση 185
4) απαλοιφή μέρους της έλικας 8 και των ελίκων 9-10, με εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στο αμινοξύ γλουταμικό οξύ στη θέση 198
5) απαλοιφή της περιοχής τυχαίου σπειράματος μεταξύ των ελίκων 9 και 10 και της έλικας 10, με εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στο αμινοξύ προλίνη στη θέση 220
6) απαλοιφή μέρους της έλικας 10, με εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στο αμινοξύ αλανίνη στη θέση 232
7) αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη στις θέσεις 185 και 186 της έλικας 7 από προλίνες
8) απαλοιφή μέρους της έλικας 8 μεταξύ των αμινοξέων 187-197 και
9) απαλοιφή μέρους της έλικας 7 μεταξύ των αμινοξέων 165-175

Οι πλασμιδιακές κατασκευές έγιναν με πολλαπλασιασμό του DNA με την τεχνική της PCR, με εκμαγείο (template) το πλασμίδιο PUC19A-I (NotI, XhoI) (368). Για τον πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκαν 2 εξωτερικοί και 2 εσωτερικοί μεταλλαγμένοι εκκινητές. Οι εσωτερικοί μεταλλαγμένοι εκκινητές είναι πλήρως επικαλυπτόμενοι και περιέχουν τις ειδικές αντικαταστάσεις ή απαλοιφές στην περιοχή του τέταρτου εξονίου

της αποA-I. Ο 5΄ εξωτερικός εκκινητής (A-INotI) αντιστοιχεί στην περιοχή 1121-1159 του τρίτου ιντρονίου της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου της αποA-I και φέρει την θέση αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο NotI (40). Ο 3΄ εξωτερικός εκκινητής (A-I XhoI) αντιστοιχεί στην μη κωδική αλυσίδα και περιλαμβάνει την περιοχή 264-300 της ενδογονιδιακής αλληλουχίας των γονιδίων αποA-I και αποC-III και φέρει την θέση αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο XhoI (40). Στον πίνακα 6 δίνονται στοιχεία για τους εκκινητές, την μετάλλαξη που προκαλούν στην αποA-I, την ακριβή αλληλουχία τους, την ακριβή θέση που ενώνονται με το γονίδιο της αποA-I, και την θερμοκρασία που γίνεται ο υβριδισμός (annealing) του κάθε εκκινητή με το πλασμίδιο PUC19A-I (NotI, XhoI). Στον ίδιο πίνακα δίνονται επίσης και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing), (seq.1 και seq.2), καθώς και οι αλληλουχίες των εξωτερικών εκκινητών A-INotI και A-I XhoI.

Σε μια αντιπροσωπευτική αντίδραση PCR ο 5΄ εκκινητής A-INotI χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τον μεταλλαγμένο εσωτερικό εκκινητή που αντιστοιχεί στην μη κωδική αλυσίδα. Επίσης ο 3΄ εκκινητής A-IXhoI χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τον μεταλλαγμένο εσωτερικό εκκινητή που αντιστοιχεί στην κωδική αλυσίδα. Και για τις δύο αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο (template) το πλασμίδιο PUC19A-I (NotI,XhoI). Η αντίδραση του πολλαπλασιασμού περιείχε 20 pmoles από τον κάθε εκκινητή, 10 ng πλασμιδίου PUC19A-I (NotI, XhoI), 400 μM dNTPs, 0.5 units του ενζύμου Vent πολυμεράση, σε διάλυμα 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 σε τελικό όγκο 50 μl. Σε κάθε περίπτωση έγινε μετουσίωση του πλασμιδίου PUC19A-I (NotI, XhoI) για ενάμιση λεπτό σε 94^o C, ακολούθησε ένωση των εκκινητών με το εκμαγείο (template) που διαρκεί ένα λεπτό σε θερμοκρασία που αναγράφεται στον πίνακα 6 και είναι διαφορετική για τον κάθε συνδυασμό εκκινητών και τέλος έγινε επέκταση της μεταξύ των εκκινητών περιοχής για ένα λεπτό σε 72^o C. Στον πίνακα 6 δίνονται οι τιμές της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών με το εκμαγείο (template) που χρησιμοποιούνται για τον κάθε συνδυασμό εσωτερικού εκκινητή με τον εξωτερικό εκκινητή. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 25 κύκλοι πολλαπλασιασμού και προέκυψαν τα προϊόντα α και β που δίνονται στην εικόνα 20.

ΕΙΚΟΝΑ 20. Σχηματική παράσταση του τρόπου δημιουργίας των μεταλλάξεων στο γονίδιο της αποA-I. Ο εξωτερικός εκκινητής A-INotI χρησιμοποιείται με τους εκκινητές Α (antisense) της μη κωδικής αλυσίδας του γονιδίου της αποA-I για την παραγωγή του προϊόντος α. Ο άλλος εξωτερικός εκκινητής A-I XhoI συνδυάζεται με τους εκκινητές S (sense) της κωδικής αλυσίδας για την παραγωγή του προϊόντος β. Ο υβριδισμός των μερικώς επικαλυπτόμενων μονόκλωνων περιοχών των προϊόντων α και β με τους εξωτερικούς εκκινητές A-INotI και A-I XhoI δίνει το τελικό προϊόν που φέρει τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο της αποA-I.


5′
NotI
Εκκινητής A
XhoI
3′
AINotI
Εκμαγείο
pUC19AI (NotI,XhoI)
3′
Εκκινητής S
AIXhoI
5′
PCR (AINotI /A)
Πρώτη ομάδα PCR
PCR (AIXhoI /S)
προϊόν α
προϊόν β
Δεύτερη PCR
(AINotI / AIXhoI)
Δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί
NotI
XhoI
Τελικό προϊόν PCR που
φέρει την μετάλλαξη

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση	Θερμ. υβριδισμού	Προϊόν (bp)	Μετάλ Χ
165A	CTCGTCGCTGTA**TTA**GGCCAGATGCGT	649-675 A	65 ^{o} C	1α (470)	Δ
165S	ACGCATCTGGCC**TAA**TACAGCGACGAG	649-675 S	65 ^{o} C	1β (605)	
175A	CTCAAGGCGCGC**TTA**CAAGCGCTGGCG	679-705 A	62 ^{o} C	2α (500)	Δ
175S	CGCCAGCGCTTG**TAA**GCGCGCCTTGAG	679-705 S	65^{o} C	2β (575)	
185A	CAGTCTGGCGCC**TTA**GTTCTCCTT	712-735 A	65 ^{o} C	3α (530)	Δ
185S	AAGAGAAC**TAA**GGCGCCAGACTG	712-735 S	65 ^{o} C	3β (542)	
198A	CGTGCTCAGATG**TTA**GGTGGCCTTGGC	748-774 A	60 ^{o} C	4α (569)	Δ
198S	GCCAAGGCCACC**TAA**CATCTGAGCACG	748-774 S	60 ^{o} C	4β (506)	
220A	GCTCTCCAGCAC**TTA**CAGCAGGCCTTG	814-840 A	65 ^{o} C	5α (635)	Δ
220S	CAAGGCCTGCTG**TAA**GTGCTGGAGAGC	814-840 S	65 ^{o} C	5β (440)	
232A	GTACTCCTCGAG**TTA**GCTCAGGAAGCT	850-876 A	60 ^{o} C	6α (671)	Δ
232S	AGCTTCCTGAGC**TAA**CTCGAGGAGTAC	850-876 S	60 ^{o} C	6β (404)	
28A	CAGTCTGGC**GGGGGG**GTTCTCCTT	712-735 A	65 ^{o} C	7α (530)	
28S	AAGGAGAAC**CCCCCC**GCCAGACTG	712-735 S	65 ^{o} C	7β (542)	G185
30A	CTTCTCGCTGAGCGTGCTCAGATGCTCG CCGCCGTTCTCCTTGAGAGCCTCAAG	700-726 760-786 A	65 ^{o} C	8α (548)	Δ
30S	CTTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGCGGC GAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAG	700-726 760-786 S	62 ^{o} C	8β (521)	
23A	GTTCTCCTTGAGAGCCTCAAGGCGCGCG GCCAGATGCGTGCGCAGCGCGTCCAC	634-660 694-720 A	65 ^{o} C	9α (482)	Δ
23S	GTGGACGCGCTGCGCACGCATCTGGAA GCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGAAC	634-660 694-720 S	65 ^{o} C	9β (587)	
A-INotI	CACCTCCGCGGACAGGCGGC CGCCAGGGCCTCAGCACCC	1121-1159 S (40)			Εξωτ
A-IXhoI	TCCTCTAGAGTCGACCGG CCTTGCTCGAGCCCCTTT	264-300 A (40)			
Seq.1	GCTGAGCGTGCTCAGATGCTC	770-789 A			Εκκινητ
Seq.2	CAGCACGGGCAGCAGGCCGTT	814-834 A			

Τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων πολλαπλασιασμού (α και β) διαχωρίστηκαν σε 1% πήκτωμα αγαρόζης, μαζί με μάρτυρα χαμηλής μοριακής μάζας, ώστε να πιστοποιηθεί ότι έχουν το αναμενόμενο μέγεθος που αναγράφεται στον πίνακα 6. Τα προϊόντα αυτά έχουν μερικώς επικαλυπτόμενες περιοχές (Εικόνα 20). Ένα μικρό ποσό (4%) από το DNA που πολλαπλασιάστηκε αναμείχθη και εχρησιμοποιήθει ως εκμαγείο (template) για ένα δεύτερο κύκλο, που περιλάμβανε 25 αντιδράσεις πολλαπλασιασμού, χρησιμοποιώντας τους εξωτερικούς εκκινητές (A-INotI και A-I XhoI). Πιο αναλυτικά το πρώτο βήμα στην αντίδραση PCR περιλαμβάνει την επέκταση των 3΄ επικαλυπτόμενων περιοχών. Το σχηματιζόμενο δίκλωνο DNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο (template) για την αντίδραση PCR με τους εξωτερικούς εκκινητές. Το τελικό προϊόν αντιπροσωπεύει την αλληλουχία του cDNA της αποA-I μεταξύ των περιοριστικών θέσεων XhoI και NotI, και φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Η όλη διαδικασία παριστάνεται λεπτομερώς στην εικόνα 20. Οι τελικές συνθήκες πολλαπλασιασμού διαφέρουν από τις αρχικές αντιδράσεις ως προς την θερμοκρασία που γίνεται ο υβριδισμός των εκκινητών A-INotI και A-IXhoI με τα προϊόντα α και β και οι οποίες δίνονται στον πίνακα 7.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

Συνθήκες PCR για την δημιουργία των τελικών προϊόντων που φέρουν τις μεταλλάξεις της αποA-I

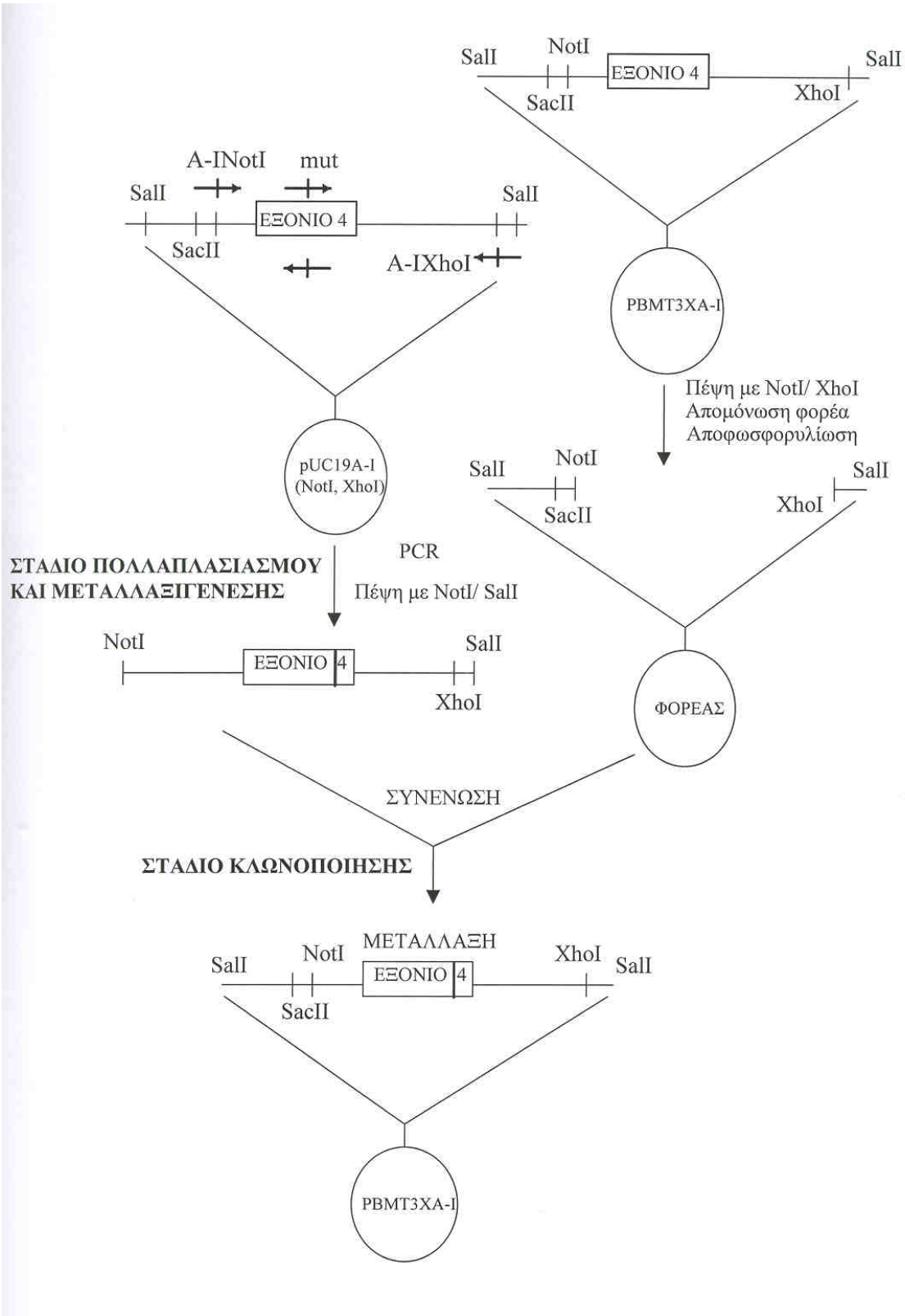
Ένωση προϊόντων Πίνακα 6	Θερμοκρασία υβριδισμού Tannealing (^{o}C)	Θερμοκρασία επέκτασης Textension (^{o}C)	Τελικό προϊόν Μέγεθος (bp)	Μετάλλαξη στην αποA-I
1α-1β	65	72	1048	Δ (165-243)
2α-2β	65	72	1048	Δ (175-243)
3α-3β	69	74	1048	Δ (185-243)
4α-4β	62	72	1048	Δ (198-243)
5α-5β	62	72	1048	Δ (220-243)
6α-6β	60	72	1048	Δ (232-243)
7α-7β	70	74	1048	G185,186-P
8α-8β	62	72	1015	Δ (187-197)
9α-9β	65	72	1015	Δ (165-175)

3. Υποκλωνοποίηση των μεταλλάξεων της αποA-I στον τελικό φορέα έκφρασης PBMT3XA-I

Τα μεταλλαγμένα τμήματα της αποA-I υπεβλήθησαν σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NotI και SalI που δημιουργούν συμπληρωματικά άκρα. Παρόμοια και ο φορέας PBMT3XA-I υπεβλήθη σε πέψη με τα ένζυμα NotI και XhoI, που δημιουργούν επίσης συμπληρωματικά άκρα. Τα μεταλλαγμένα γονίδια της αποA-I υποκλωνοποιήθηκαν στην θέση NotI-XhoI του φορέα.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι με την χρήση των πλασμιδίων PUC19A-I (NotI, XhoI) και PBMT3XA-I η μεταλλαξιγένεση του γονιδίου της αποA-I απλοποιείται και περιλαμβάνει ένα στάδιο μεταλλαξιγένεσης-πολλαπλασιασμού του DNA με εκμαγείο (template) το πλασμίδιο PUC19A-I (NotI, XhoI) και ένα στάδιο κλωνοποίησης στον φορέα έκφρασης PBMT3XA-I. Η όλη διαδικασία παριστάνεται διαγραμματικά στην εικόνα 21.

ΕΙΚΟΝΑ 21. Παρουσίαση όλων των βημάτων που οδήγησαν στην δημιουργία των μεταλλάξεων στο γονίδιο της αποA-I και περιλαμβάνουν: 1) στάδιο πολλαπλασιασμού και μεταλλαξιγένεσης στον φορέα PUC19A-I (NotI, XhoI) και 2) στάδιο κλωνοποίησης στον φορέα έκφρασης PBMT3XA-I.


SalI
NotI
ΕΞΟΝΙΟ 4
SalI
SacII
XhoI
A-INotI
mut
SalI
ΕΞΟΝΙΟ 4
SalI
SacII
A-IXhoI
PBMT3XA-I
Πέψη με NotI/ XhoI
Απομόνωση φορέα
Αποφωσφορυλίωση
pUC19A-I
(NotI, XhoI)
SalI
NotI
SacII
XhoI
SalI
ΣΤΑΔΙΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ
ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ
PCR
Πέψη με NotI/ SalI
NotI
ΕΞΟΝΙΟ 4
SalI
XhoI
ΦΟΡΕΑΣ
ΣΥΝΕΝΩΣΗ
ΣΤΑΔΙΟ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ
SalI
NotI
ΕΞΟΝΙΟ 4
XhoI
SalI
SacII
PBMT3XA-I

4. Κυτταρική επιμόλυνση, επιλογή και χαρακτηρισμός σταθερών κυτταρικών γραμμών που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I

Α) Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια έκφρασης του γονιδίου αποA-I ταυτοποιήθηκαν αρχικά με προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing). Στη συνέχεια τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς C127, που προέρχεται από όγκο μαστικού αδένα του ποντικού με την μέθοδο της συνκατακρήμνισης DNA-$Ca_3(PO_4)_2$. Η σειρά C127 δεν εκφράζει καμμιά ενδογενή απολιποπρωτεΐνη και σε συνδυασμό με το σύστημα της έκφρασης που βασίζεται στον ϊό βοΐου θηλώματος (BPV) επιτρέπει υψηλά επίπεδα έκφρασης του ανασυνδυασμένου γονιδίου της αποA-I. Ακολούθησε επιλογή των σταθερών κυτταρικών γραμμών που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης αποA-I. Για την επιλογή πραγματοποιήθηκε επώαση των επιμολυσμένων κυττάρων με $CdCl_2$ σε συγκεντρώσεις 10 μM και σε μερικές περιπτώσεις 20 μM, όπως αναφέρεται αναλυτικά στις μεθόδους. Με την παρουσία του $CdCl_2$ επιτυγχάνεται: 1) η επιλογή των κυττάρων που έχουν ενσωματώσει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και επίσης εκφράζουν το γονίδιο της μεταλλοθειονίνης του ανθρώπου και κατά συνέπεια αναπτύσσονται σε συγκέντρωση 10 μM $CdCl_2$ δίνοντας σταθερές κυττταρικές σειρές και 2) η επαγωγή του υποκινητή του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης του ποντικού του πλασμιδίου PBMT3XA-I, παρουσία του $CdCl_2$ με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου της αποA-I που είναι υπό τον έλεγχό του εν λόγω γονιδίου.

Για τον χαρακτηρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης αποA-I ακολουθείται η εξής διαδικασία: οι σταθερές κυτταρικές γραμμές επωάσθηκαν σε θρεπτικά υλικά απουσία μεθειονίνης και ως αποτέλεσμα της επώασης αυτής τα κύτταρα λαμβάνουν ραδιοσημασμένη (με ^{35}S) μεθειονίνη, η οποία ενσωματώνεται σε όλες τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες. Η όλη διαδικασία της ραδιοσήμανσης έχει περιγραφεί αναλυτικά στις μεθόδους. Για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών συνελέγη το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας που περιέχει τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και την αποA-I. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση του μέσου καλλιέργειας με το αντίσωμα για την ανθρώπινη αποA-I, με χρήση της πρωτεΐνης του σταφυλοκόκκου A (staph A), όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Η ανάλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης αποA-I έγινε με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS και αυτοραδιογραφία. Η

ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στο αυτοραδιογράφημα χρησιμοποιείται ως δείκτης για να εκτιμηθεί το ποσό της εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Τελικά επιλέγησαν οι κυτταρικές σειρές που εκκρίνουν τα υψηλότερα ποσά της αποA-I, για την παραπέρα καλλιέργεια τους σε μεγάλη κλίμακα, με σκοπό τον καθαρισμό των εκκρινόμενων πρωτεϊνών.

Β) Ανάλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία

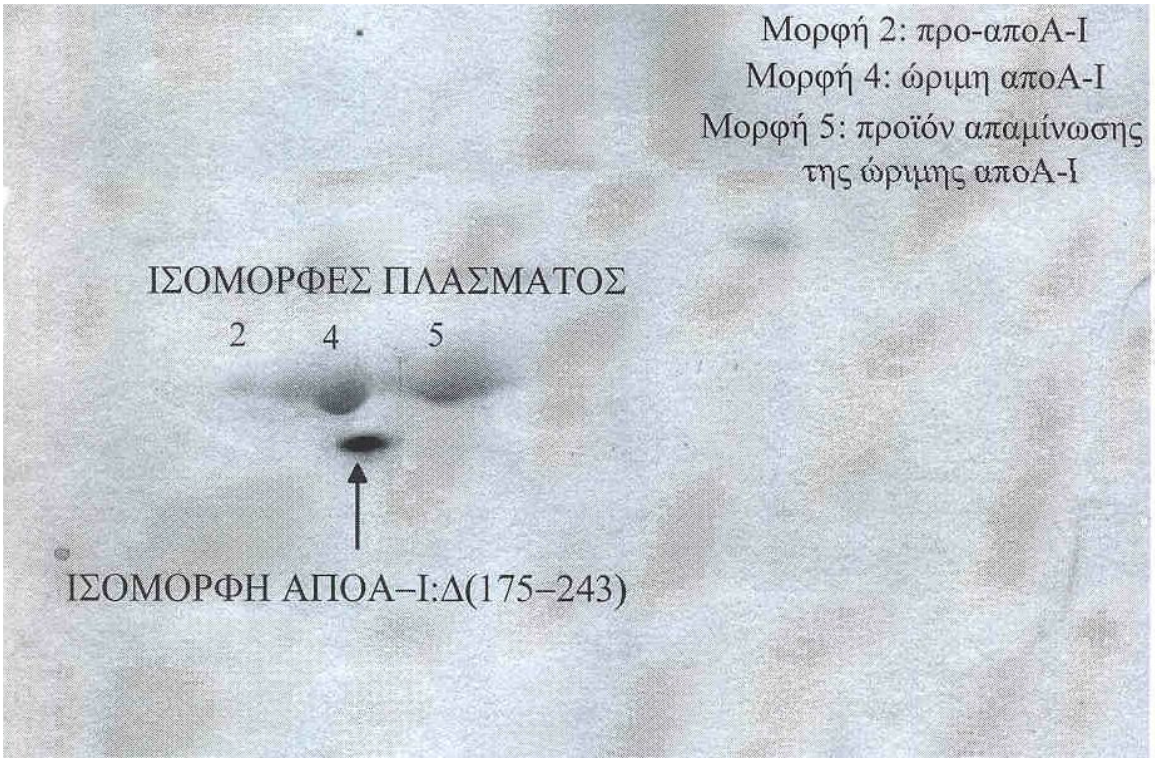
Η ανάλυση αυτή επιτρέπει την σύγκριση του φορτίου (ισοηλεκτρικού σημείου) και του μεγέθους της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με τις ισοπρωτεΐνες 2, 4 και 5 της αποA-I του πλάσματος. Για την ανάλυση αυτή κύτταρα C127 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Τα κύτταρα ιχνοθετήθηκαν με ^{35}S μεθειονίνη, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους και η αποA-I κατακρημνίσθηκε με το αντίσωμά της. Στη συνέχεια αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία, χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη φυσικού τύπου, αποA-I του πλάσματος, ως εσωτερικό μάρτυρα.

Το πήκτωμα χρωματίστηκε με χρωστική Coomasie Brilliant Blue για να προσδιορισθεί η θέση των ισοπρωτεϊνών της αποA-I του πλάσματος. Η αυτοραδιογραφία έδειξε την θέση της νεοσυντεθείσας αποA-I, ενώ η επικάλυψη του πηκτώματος με την αυτοραδιογραφία καθόρισε τις διαφορές του φορτίου και του μεγέθους μεταξύ των ισομορφών της αποA-I του πλάσματος και των νεοσυντεθεισών μορφών της αποA-I. Επομένως χρησιμοποιώντας αυτή την ανάλυση οι μεταλλάξεις της αποA-I που έχουν διαφορετικό μέγεθος ή φορτίο διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν κατόπιν συσχετισμού με τις ισοπρωτεΐνες της αποA-I του πλάσματος.

Οι εικόνες 22-26 δείχνουν τα αποτελέσματα από την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I. Όλες οι εικόνες δείχνουν την επικάλυψη του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης (χρωματισμένο με Coomassie Brilliant Blue) με το αυτοραδιογράφημα που περιέχει τις ραδιοσημασμένες μορφές της αποA-I. Η πρωτεΐνη αποA-I του πλάσματος είναι μια πολυμορφική πρωτεΐνη. Στο πήκτωμα είναι εμφανείς η ισομορφή 2, που είναι η προ-αποA-I, η ισομορφή 4, που αποτελεί την ώριμη μορφή του πλάσματος και η ισομορφή 5, που αποτελεί το προιόν μη ενζυματικής απαμίνωσης της ισομορφής 4. Η ισομορφή 2 έχει δύο περισσότερα θετικά φορτία σε σχέση με την ισομορφή 4, και η ισομορφή 5 έχει ένα περισσότερο αρνητικό φορτίο σε σχέση με την ισομορφή 4 (Εικόνα 6).

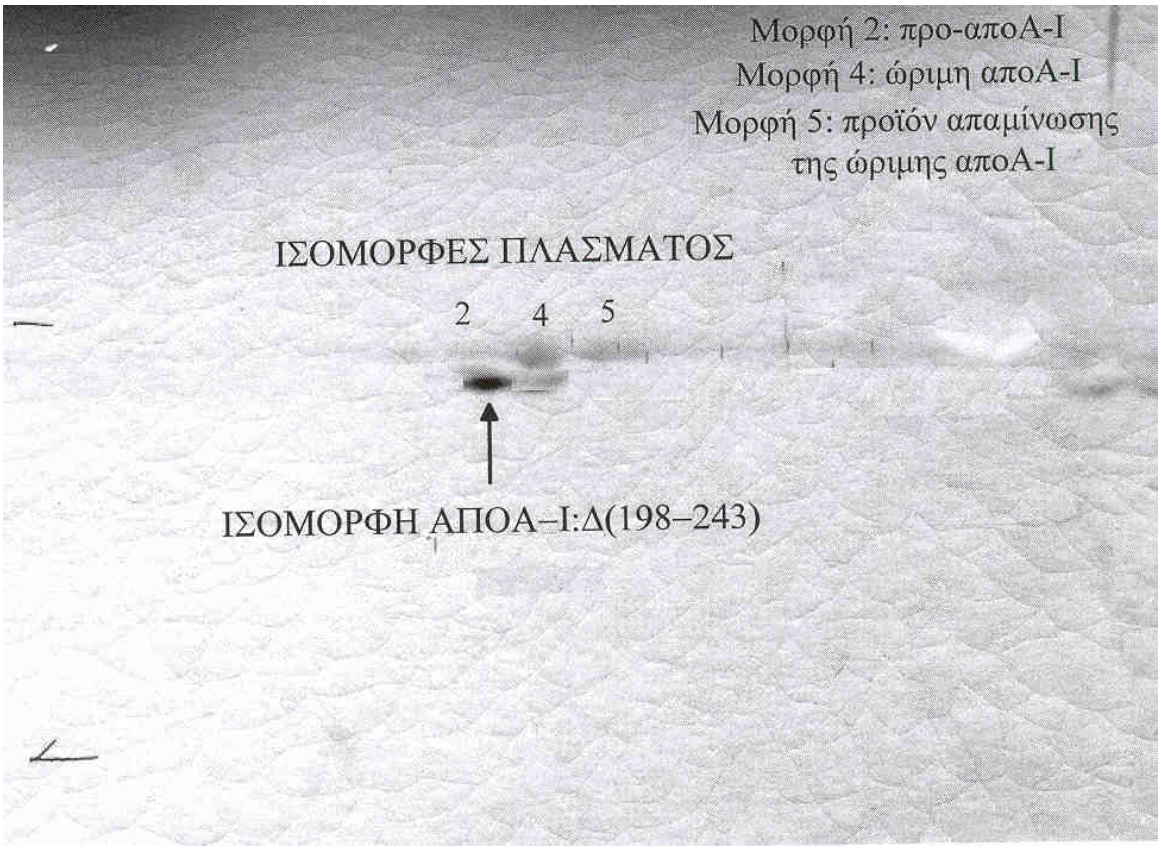
Η εικόνα 22 δείχνει την ανάλυση της μορφής αποA-I: Δ(175→243). Η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη είναι μικρότερη σε μέγεθος και έχει 2 μονάδες περισσότερο αρνητικό φορτίο σε σχέση με την ισομορφή 2 του φυσικού τύπου (προ-αποA-I μορφή). Αυτό συμφωνεί με την καθαρή απώλεια 2 θετικών φορτίων (η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 10 αρνητικά φορτισμένα και 12 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα). Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 68 αμινοξέων.

ΕΙΚΟΝΑ 22. Ανάλυση της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ-Ι που εκκρίνεται από κύτταρα που εκφράζουν αποΑ-Ι: Δ(175→243) με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία. Η αποΑ-Ι που εκκρίνεται από τον κυτταρικό κλώνο αποΑ-Ι: Δ(175→243) εσημάνθη με ^{35}S-μεθειονίνη. Οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίσθησαν και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Το μείγμα που διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση περιέχει περίπου 20 μg αποΑ-Ι πλάσματος, μαζί με 30.000 κρούσεις της αποΑ-Ι: Δ(175→243), μετά από ανοσοκατακρήμνισή της με το αντίσωμα της αποΑ-Ι του ανθρώπου. Η εικόνα δείχνει την επικάλυψη του πηκτώματος ακρυλαμιδίου μετά από χρωματισμό/αποχρωματισμό και ξήρανση, από την αυτοραδιογραφία. Η ακριβής επικάλυψη έγινε με την βοήθεια τριών κοινών σημείων αναφοράς στις δύο επιφάνειες. Τα σημεία αυτά αντιπροσωπεύουν φθορίζουσες κηλίδες που τοποθετήθηκαν στις γωνίες του πηκτώματος και εντοπίζονται με την αυτοραδιογραφία. Η βασική πλευρά είναι στα αριστερά (κάθοδος) και η όξινη πλευρά είναι στα δεξιά (άνοδος). Η εικόνα δείχνει ότι η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη αποΑ-Ι έχει μικρότερο μέγεθος και έχει 2 μονάδες περισσότερο αρνητικό φορτίο σε σχέση με το φορτίο της ισοπρωτεΐνης 2 του φυσικού τύπου (προ-αποΑ-Ι). Αυτή η διαφορά φορτίου συμφωνεί με την συνολική απώλεια 2 θετικών φορτίων (η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 10 αρνητικά φορτισμένα και 12 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα). Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 68 αμινοξέων. Η θέση της ραδιοσημασμένης αποΑ-Ι είναι κάτω από την ισομορφή 4 του πλάσματος (ώριμη αποΑ-Ι) και είναι συμβατή με την μετάλλαξη.


Μορφή 2: προ-αποΑ-Ι
Μορφή 4: ώριμη αποΑ-Ι
Μορφή 5: προϊόν απαμίνωσης της ώριμης αποΑ-Ι
ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
2
4
5
ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι:Δ(175–243)

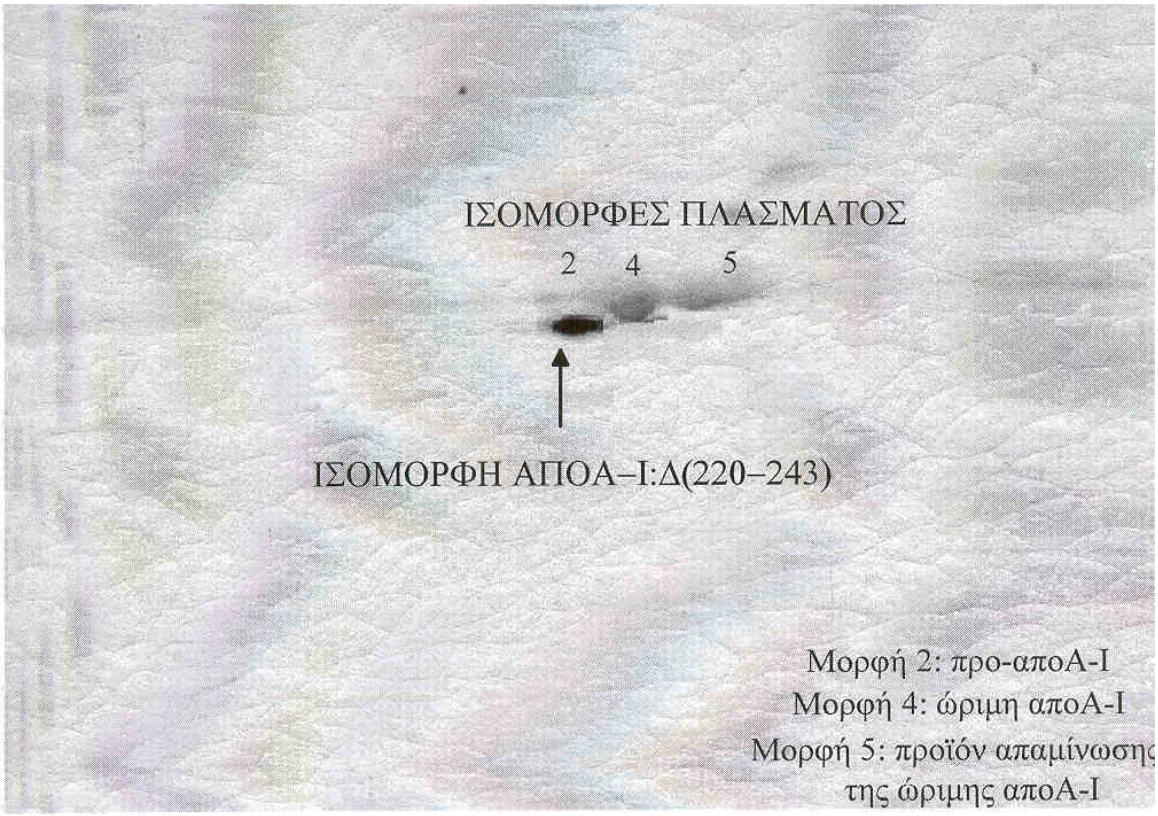
Η εικόνα 23 δείχνει την ανάλυση της μορφής αποA-I: Δ(198→243). Η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη είναι μικρότερη σε μέγεθος και έχει περισσότερο αρνητικό φορτίο κατά μία μονάδα σε σχέση με την ισομορφή 2 του φυσικού τύπου (προ-αποA-I). Αυτό συμφωνεί με την καθαρή απώλεια 1 θετικού φορτίου (η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 6 αρνητικά φορτισμένα και 7 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα). Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 45 αμινοξέων.

ΕΙΚΟΝΑ 23. Ανάλυση της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ-Ι που εκκρίνεται από κύτταρα που εκφράζουν αποΑ-Ι: Δ(198→243) με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία. Η αποΑ-Ι που εκκρίνεται από τον κυτταρικό κλώνο αποΑ-Ι: Δ(198→243) εσημάνθη με ^{35}S-μεθειονίνη. Οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίσθησαν και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Το μείγμα που διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση περιέχει περίπου 10 μg αποΑ-Ι πλάσματος, μαζί με 30.000 κρούσεις της αποΑ-Ι: Δ(198→243), μετά από ανοσοκατακρήμνισή της με το αντίσωμα της αποΑ-Ι του ανθρώπου. Η εικόνα δείχνει την επικάλυψη του πηκτώματος ακρυλαμιδίου μετά από χρωματισμό/αποχρωματισμό και ξήρανση, από την αυτοραδιογραφία. Η ακριβής επικάλυψη έγινε με την βοήθεια τριών κοινών σημείων αναφοράς στις δύο επιφάνειες. Τα σημεία αυτά αντιπροσωπεύουν φθορίζουσες κηλίδες που τοποθετήθηκαν στις γωνίες του πηκτώματος και εντοπίζονται με την αυτοραδιογραφία. Η βασική πλευρά είναι στα αριστερά (κάθοδος) και η όξινη πλευρά είναι στα δεξιά (άνοδος). Η εικόνα δείχνει ότι η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη αποΑ-Ι έχει μικρότερο μέγεθος και έχει μια μονάδα περισσότερο αρνητικό φορτίο σε σχέση με το φορτίο της ισοπρωτεΐνης 2 του φυσικού τύπου (προ-αποΑ-Ι). Αυτή η διαφορά φορτίου συμφωνεί με την συνολική απώλεια ενός θετικού φορτίου (η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 6 αρνητικά φορτισμένα και 7 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα). Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 45 αμινοξέων. Η θέση της ραδιοσημασμένης αποΑ-Ι είναι μεταξύ των ισομορφών 2 (προ-αποΑ-Ι) και 4 (ώριμη αποΑ-Ι) του πλάσματος και είναι συμβατή με την μετάλλαξη.


Μορφή 2: προ-αποΑ-Ι
Μορφή 4: ώριμη αποΑ-Ι
Μορφή 5: προϊόν απαμίνωσης της ώριμης αποΑ-Ι
ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
2
4
5
ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι:Δ(198–243)

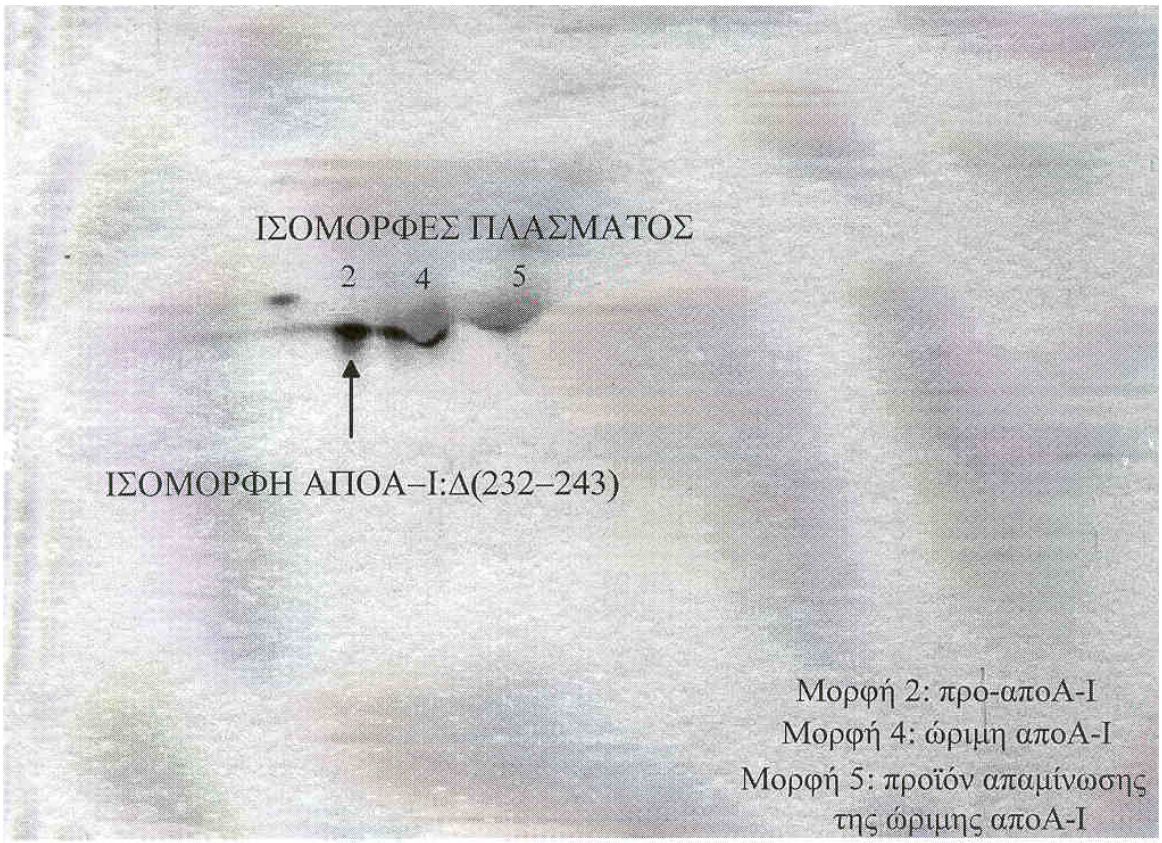
Στην εικόνα 24 φαίνεται η ανάλυση της μορφής αποA-I: Δ(220→243). Η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη είναι μικρότερη σε μέγεθος και δεν έχει αλλαγή στο ολικό φορτίο σε σχέση με την ισομορφή 2 του φυσικού τύπου (προ-αποA-I μορφή). Η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 3 αρνητικά φορτισμένα και 3 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα. Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 23 αμινοξέων.

ΕΙΚΟΝΑ 24. Ανάλυση της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ-Ι που εκκρίνεται από κύτταρα που εκφράζουν αποΑ-Ι: Δ(220→243) με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία. Η αποΑ-Ι που εκκρίνεται από τον κυτταρικό κλώνο αποΑ-Ι: Δ(220→243) εσημάνθη με ^{35}S-μεθειονίνη. Οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίσθησαν και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Το μείγμα που διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση περιέχει περίπου 15 μg αποΑ-Ι πλάσματος, μαζί με 28.000 κρούσεις της αποΑ-Ι: Δ(220→243), μετά από ανοσοκατακρήμνισή της με το αντίσωμα της αποΑ-Ι του ανθρώπου. Η εικόνα δείχνει την επικάλυψη του πηκτώματος ακρυλαμιδίου μετά από χρωματισμό/αποχρωματισμό και ξήρανση, από την αυτοραδιογραφία. Η ακριβής επικάλυψη έγινε με την βοήθεια τριών κοινών σημείων αναφοράς στις δύο επιφάνειες. Τα σημεία αυτά αντιπροσωπεύουν φθορίζουσες κηλίδες που τοποθετήθηκαν στις γωνίες του πηκτώματος και εντοπίζονται με την αυτοραδιογραφία. Η βασική πλευρά είναι στα αριστερά (κάθοδος) και η όξινη πλευρά είναι στα δεξιά (άνοδος). Η εικόνα δείχνει ότι η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη αποΑ-Ι έχει μικρότερο μέγεθος και το ίδιο συνολικό φορτίο σε σχέση με την ισοπρωτεΐνη 2 του φυσικού τύπου (προ-αποΑ-Ι) (η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 3 αρνητικά φορτισμένα και 3 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα). Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 23 αμινοξέων. Η θέση της ραδιοσημασμένης αποΑ-Ι είναι κάτω από την ισομορφή 2 του πλάσματος (προ-αποΑ-Ι) και είναι συμβατή με την μετάλλαξη.


ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
2 4 5
ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι:Δ(220–243)
Μορφή 2: προ-αποΑ-Ι
Μορφή 4: ώριμη αποΑ-Ι
Μορφή 5: προϊόν απαμίνωσης
της ώριμης αποΑ-Ι

Η εικόνα 25 δείχνει την ανάλυση της μορφής αποΑ-Ι: Δ(232→243). Η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη είναι μικρότερη σε μέγεθος και δεν έχει αλλαγή στο συνολικό φορτίο σε σχέση με την ισομορφή 2 του φυσικού τύπου (προ-αποΑ-Ι μορφή). Η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 2 αρνητικά φορτισμένα και 2 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα. Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 11 αμινοξέων. Η άλλη ισομορφή που εμφανίζεται στο αυτοραδιογράφημα αποτελεί πιθανώς προϊόν απαμίνωσης ή καρβαμυλίωσης (carbamylation) της μεταλλαγμένης προ-αποΑ-Ι μορφής. Τα προϊόντα καρβαμυλίωσης μπορεί να δημιουργηθούν με την αλληλεπίδραση των αμινο-ομάδων της πρωτεΐνης με την ουρία των πηκτωμάτων κατά την ισοηλεκτρική εστίαση.

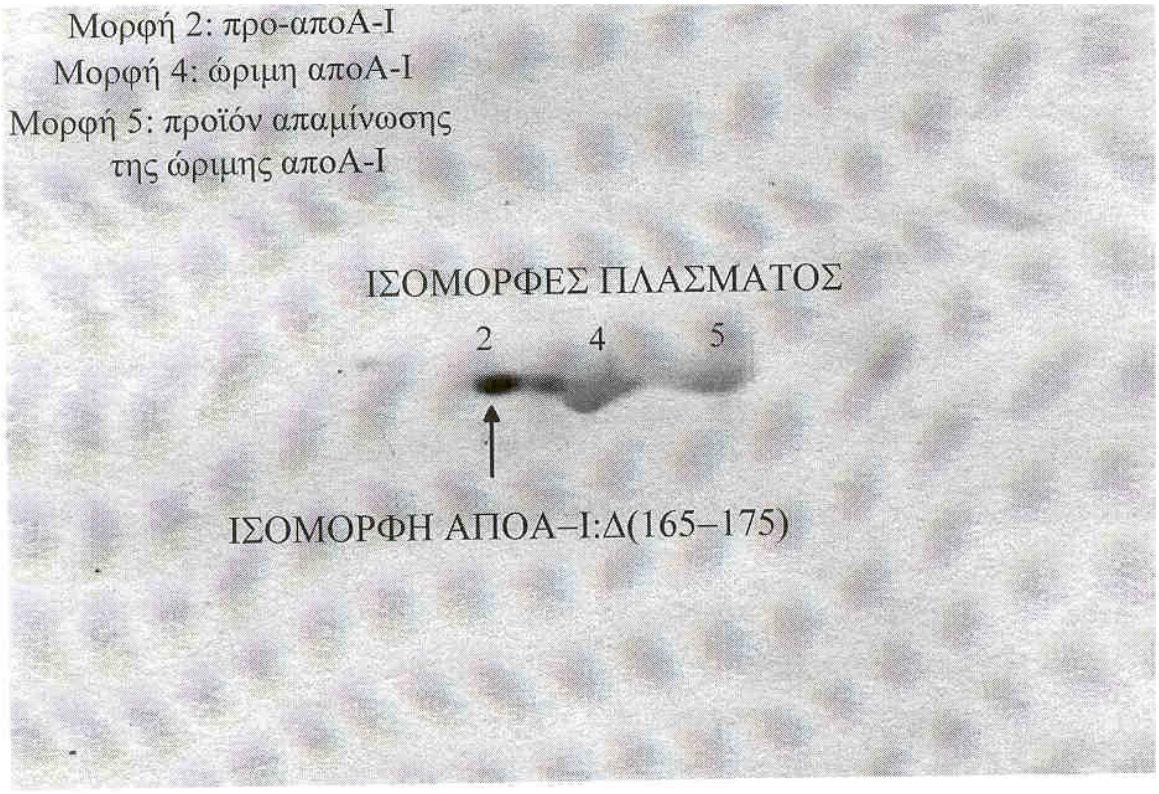
ΕΙΚΟΝΑ 25. Ανάλυση της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ-Ι που εκκρίνεται από κύτταρα που εκφράζουν αποΑ-Ι: Δ(232→243) με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία. Η αποΑ-Ι που εκκρίνεται από τον κυτταρικό κλώνο αποΑ-Ι: Δ(232→243) εσημάνθη με ^{35}S-μεθειονίνη. Οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίσθησαν και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Το μείγμα που διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση περιέχει περίπου 15 μg αποΑ-Ι πλάσματος, μαζί με 33.000 κρούσεις της αποΑ-Ι: Δ(232→243), μετά από ανοσοκατακρήμνισή της με το αντίσωμα της αποΑ-Ι του ανθρώπου. Η εικόνα δείχνει την επικάλυψη του πηκτώματος ακρυλαμιδίου μετά από χρωματισμό/αποχρωματισμό και ξήρανση, από την αυτοραδιογραφία. Η ακριβής επικάλυψη έγινε με την βοήθεια τριών κοινών σημείων αναφοράς στις δύο επιφάνειες. Τα σημεία αυτά αντιπροσωπεύουν φθορίζουσες κηλίδες που τοποθετήθηκαν στις γωνίες του πηκτώματος και εντοπίζονται με την αυτοραδιογραφία. Η βασική πλευρά είναι στα αριστερά (κάθοδος) και η όξινη πλευρά είναι στα δεξιά (άνοδος). Η εικόνα δείχνει ότι η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη αποΑ-Ι έχει μικρότερο μέγεθος και το ίδιο συνολικό φορτίο σε σχέση με την ισοπρωτεΐνη 2 (προ-αποΑ-Ι) του φυσικού τύπου (η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 2 αρνητικά φορτισμένα και 2 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα). Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 11 αμινοξέων. Η θέση της ραδιοσημασμένης αποΑ-Ι είναι κάτω από την ισομορφή 2 του πλάσματος (προ-αποΑ-Ι) και είναι συμβατή με την μετάλλαξη. Η εμφάνιση των άλλων πρωτεϊνών της εικόνας εξηγείται στα αποτελέσματα.


ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
2
4
5
ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι:Δ(232–243)
Μορφή 2: προ-αποΑ-Ι
Μορφή 4: ώριμη αποΑ-Ι
Μορφή 5: προϊόν απαμίνωσης
της ώριμης αποΑ-Ι

Η εικόνα 26 δείχνει την ανάλυση της αποA-I: Δ(165→175). Η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη είναι λίγο μικρότερη σε μέγεθος και δεν έχει αλλαγή στο συνολικό φορτίο σε σχέση με την ισομορφή 2 του φυσικού τύπου (προ-αποA-I). Η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 2 αρνητικά φορτισμένα και 2 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα. Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 11 αμινοξέων. Η ισομορφή αυτή φαίνεται ότι συμπίπτει με την ισομορφή 2 του πλάσματος στην εικόνα 9. Αυτό οφείλεται στην μικρή διαφορά μεγέθους (11 αμινοξέα) και στην μεγαλύτερη διαφορά των ποσοτήτων της κάθε πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση. Η ανάλυση επίσης δείχνει και ένα ελάχιστο ποσό προϊόντος απαμίνωσης ή καρβαμυλίωσης της νεοσυντεθείσας ισομορφής.

Η ανάλυση των υπολοίπων μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, αποA-I: Δ(165→243), αποA-I: Δ(185→243), αποA-I: Δ(187→197), και αποA-I: (G185,G185→P185,P186), με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων έχει περιγραφεί αναλυτικά στα πλαίσια της εργασίας του Master, με τίτλο Σχέση δομής-λειτουργίας της απολιποπρωτεΐνης A-I του ανθρώπου.

ΕΙΚΟΝΑ 26. Ανάλυση της μεταλλαγμένης μορφής αποΑ-Ι που εκκρίνεται από κύτταρα που εκφράζουν αποΑ-Ι: Δ(165→175) με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία. Η αποΑ-Ι που εκκρίνεται από τον κυτταρικό κλώνο αποΑ-Ι: Δ(165→175) εσημάνθη με ^{35}S-μεθειονίνη. Οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίσθησαν και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και αυτοραδιογραφία, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Το μείγμα που διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση περιέχει περίπου 15 μg αποΑ-Ι πλάσματος, μαζί με 23.000 κρούσεις της αποΑ-Ι: Δ(165→175), μετά από ανοσοκατακρήμνισή της με το αντίσωμα της αποΑ-Ι του ανθρώπου. Η εικόνα δείχνει την επικάλυψη του πηκτώματος ακρυλαμιδίου μετά από χρωματισμό/αποχρωματισμό και ξήρανση, από την αυτοραδιογραφία. Η ακριβής επικάλυψη έγινε με την βοήθεια τριών κοινών σημείων αναφοράς στις δύο επιφάνειες. Τα σημεία αυτά αντιπροσωπεύουν φθορίζουσες κηλίδες που τοποθετήθηκαν στις γωνίες του πηκτώματος και εντοπίζονται με την αυτοραδιογραφία. Η βασική πλευρά είναι στα αριστερά (κάθοδος) και η όξινη πλευρά είναι στα δεξιά (άνοδος). Η εικόνα δείχνει ότι η νεοσυντεθείσα πρωτεΐνη αποΑ-Ι έχει μικρότερο μέγεθος και το ίδιο συνολικό φορτίο σε σχέση με την ισοπρωτεΐνη 2 του φυσικού τύπου (προ-αποΑ-Ι) (η ακολουθία που έχει απαλοιφεί περιέχει 2 αρνητικά φορτισμένα και 2 θετικά φορτισμένα υπολλείμματα). Η αλλαγή στο μέγεθος είναι συμβατή με την απώλεια 11 αμινοξέων. Η θέση της ραδιοσημασμένης αποΑ-Ι είναι κάτω από την ισομορφή 2 του πλάσματος (προ-αποΑ-Ι) και είναι συμβατή με την μετάλλαξη. Η εμφάνιση των άλλων πρωτεϊνών της εικόνας εξηγείται στα αποτελέσματα.


Μορφή 2: προ-αποΑ-Ι
Μορφή 4: ώριμη αποΑ-Ι
Μορφή 5: προϊόν απαμίνωσης της ώριμης αποΑ-Ι
ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
2
4
5
ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι:Δ(165–175)

5. Απομόνωση του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I από το μέσο καλλιέργειας

Η παραγωγή και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες αποτελεί ένα απαραίτητο βήμα για την περαιτέρω μελέτη της φυσιολογικής λειτουργίας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα για την πρωτεΐνη αποA-I, πολλές λειτουργικές μελέτες, όπως η κινητική ανάλυση της ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT, η σύνδεση με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων, η σύνδεση με τον υποδοχέα SR-BI, οι μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και οι μελέτες διασύνδεσης (cross-linking) απαιτούν την χρήση μεγάλων ποσών καθαρής πρωτεΐνης. Η παραγωγή της αποA-I σε μεγάλη κλίμακα επετεύχθη με την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές σε περιστρεφόμενες κυλινδρικές φιάλες (roller bottles). Με το σύστημα αυτό τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μικροσφαιρίδια από μόλυβδο (διαμέτρου 100 μm), που καλύπτονται από κολλαγόνο το οποίο παρέχει το υλικό για την κυτταρική προσκόλληση. Τα μικροσφαιρίδια είναι πορώδη και η ιδιότητά τους αυτή επιτρέπει στα κύτταρα να μεγαλώσουν όχι μόνο στην επιφάνεια αλλά και στο εσωτερικό τους. Το σύστημα αυτό παρέχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα : 1) αυξάνεται σημαντικά η συνολική επιφάνεια, οδηγώντας σε αυξημένη κυτταρική πυκνότητα ανά ml, 2) η σταθερή περιστροφή των φιαλών, σε συνδυασμό με την αύξηση της αναλογίας επιφάνειας προς τον όγκο του θρεπτικού μέσου, επιτρέπει την αυξημένη ταχύτητα ανταλλαγής αερίων και 3) η χρήση των περιστρεφόμενων φιαλών είναι εύκολη συγκριτικά με άλλα συστήματα καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα και επιτρέπει τον ταυτόχρονη καλλιέργεια μεγάλου αριθμού διαφορετικών κυτταρικών σειρών (μέχρι και 100).

Τα κύτταρα συνήθως συντηρούνται σε θρεπτικό μέσο παρουσία 5% ορού εμβρύου μόσχου. Για την συλλογή του μέσου καλλιέργειας, που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, τα κύτταρα επωάσθηκαν αρχικά με θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 2 ώρες και στη συνέχεια όλη τη νύχτα με 100 ml από το ίδιο θρεπτικό μέσο (αναλυτική περιγραφή στο τμήμα 6ΣΤ των μεθόδων). Την επόμενη μέρα συνελέχθη το μέσο καλλιέργειας και η διαδικασία επαναλήφθη μία ή δύο φορές την εβδομάδα, μέχρι να επιτευχθεί συνολική συλλογή 1-1.5 λίτρων μέσου καλλιέργειας.

Το θρεπτικό μέσο συγκεντρώθηκε σε όγκο 50 ml, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους (τμήμα 10) και υπέστη κλασμάτωση σε στήλη ανιονικής χρωματογραφίας (Hitrap-Q, Pharmacia) σε μηχάνημα FPLC, για την απομάκρυνση της αλβουμίνης ορού μόσχου που δεν απεμακρύνθη κατά την έκπλυση των κυττάρων. Η ιονική

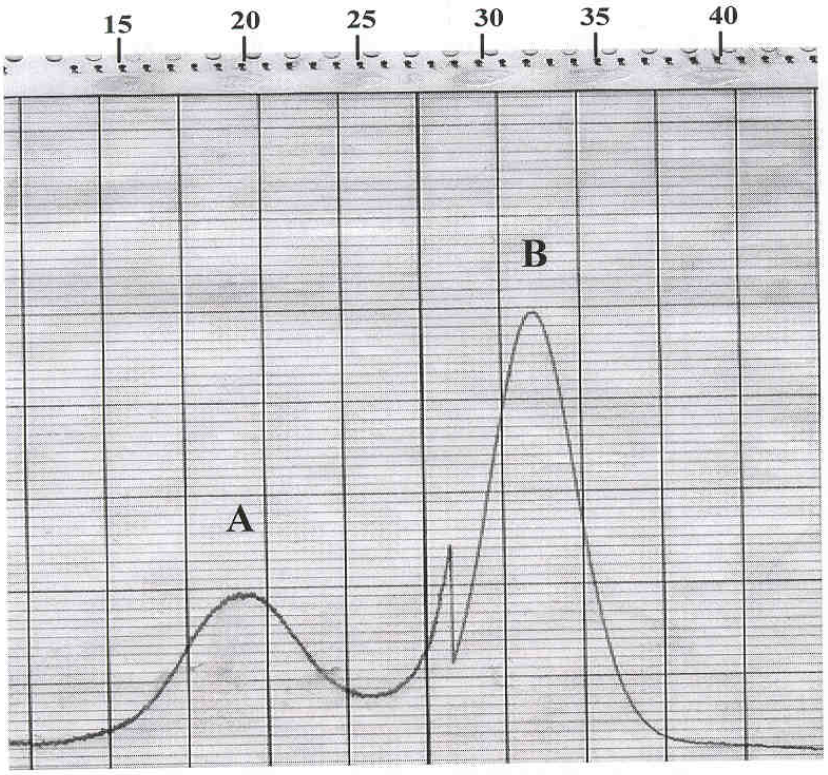
χρωματογραφία βασίζεται σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών του μέσου καλλιέργειας με τις αντίθετα φορτισμένες ομάδες του στερεού υλικού της χρωματογραφίας. Το μέσο καλλιέργειας προσαρμοσμένο σε pH 8 και μικρή ιοντική ισχύ εφορτώθη στην ανιοανταλλακτική στήλη. Η αποA-I σε pH 8 που είναι μεγαλύτερο από το ισοηλεκτρικό της σημείο έχει αρνητικό φορτίο και προσδένεται στην στήλη της ανιονικής χρωματογραφίας. Η έκλουση της αποA-I από την στήλη επιτυγχάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης άλατος του διαλύματος έκλουσης κατά βήματα (step gradient). Οι χρωματογραφικές συνθήκες έχουν περιγραφεί αναλυτικά στις μεθόδους (τμήμα 10). Τα συλλεχθέντα κλάσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS. Τα κλάσματα που περιείχαν την πλειονότητα της καθαρής μορφής της αποA-I ενώθηκαν και συγκεντρώθηκαν ξανά σε μικρότερο όγκο (1-2 ml) με χρήση μικροσυγκεντρωτών Amicon.

Το δεύτερο βήμα καθαρισμού περιλάμβανε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration) με χρήση της στήλης HiPrep Sephacryl S-200, όπως έχει περιφραφεί στις μεθόδους. Η στήλη αποτελείται από ένα πολυμερές αλλυλ-δεξτράνης και N,N-μεθυλεν-δισακρυλαμιδίου και έχει ικανότητα διαχωρισμού πρωτεϊνών μοριακής μάζας που κυμαίνεται από 5 σε 250 KDa. Τα κλάσματα που ελήφθησαν αναλύθηκαν για την καθαρότητα τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, παρουσία SDS. Συνολικά 1-1.5 λίτρα καλλιέργειας δίνουν 0.8 έως 3 mg καθαρής πρωτεΐνης (καθαρότητας 95-99%).

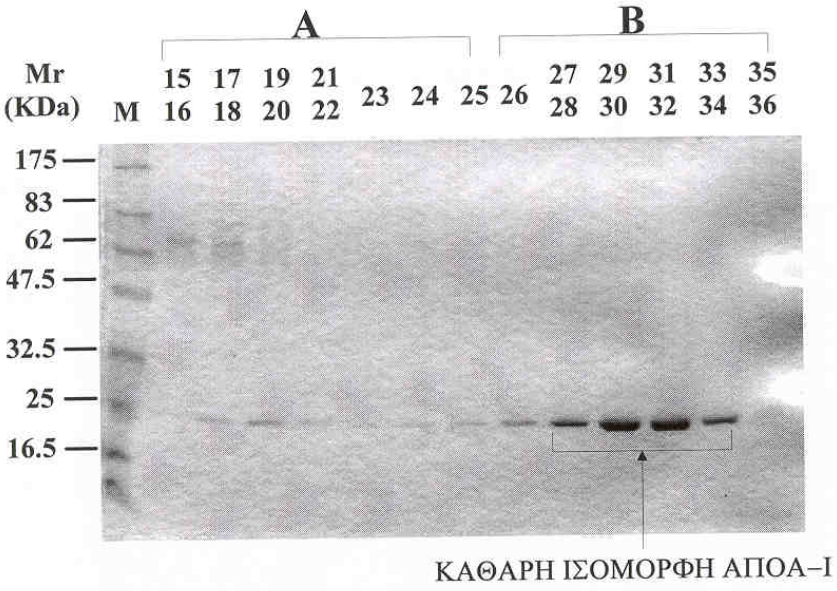
Τα διαγράμματα καθαρισμού των διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I καθώς και του ανασυνδυασμένου φυσικού τύπου της αποA-I δίνονται στην εικόνα 27 (Α-Θ). Σε κάθε εικόνα σημειώνονται με βέλη τα κλάσματα με την μεγαλύτερη καθαρότητα ισομορφής της αποA-I, που επιλέχθηκαν για τις επακόλουθες λειτουργικές μελέτες.

ΕΙΚΟΝΑ 27 (Α-Θ). Διάγραμμα καθαρισμού για τον ανασυνδυασμένο φυσικό τύπο και τις μεταλλαγμένες μορφές αποΑ-Ι. Το θρεπτικό μέσο που συλλέχθηκε από τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στις περιστρεφόμενες κυλινδρικές φιάλες συγκεντρώθηκε σε όγκο 50 ml και υπεβλήθη σε κλασμάτωση με χρωματογραφία FPLC, με χρήση ανιοανταλλακτικής στήλης (στήλη Hitrap-Q), για την απομάκρυνση της αλβουμίνης του ορού μόσχου. Τα εμπλουτισμένα σε αποΑ-Ι κλάσματα υπεβλήθησαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με χρήση στήλης HiPrep Sephacryl S-200, όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στα υλικά και μεθόδους. Α: Μορφή αποΑ-Ι: Δ(185→243), Β: Μορφή αποΑ-Ι: Δ(198→243), Γ: Μορφή αποΑ-Ι: Δ(220→243), Δ: Μορφή αποΑ-Ι: Δ(232→243), Ε: Μορφή αποΑ-Ι: (G185,G186→P185,P186), ΣΤ: Μορφή αποΑ-Ι: Δ(187→197), Η: Μορφή αποΑ-Ι: Δ(165→175) και Θ: φυσικός τύπος αποΑ-Ι. Το πάνω τμήμα της κάθε εικόνας δείχνει το διάγραμμα έκλουσης από την στήλη HiPrep Sephacryl S-200. Ο αριθμός των κλασμάτων μετριέται και καταγράφεται ανά 3 ml, και οι κορυφές (peaks) σημειώνονται με Α, Β και Γ. Το κάτω τμήμα της εικόνας δείχνει την ανάλυση δείγματος 5 μl με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS, των κλασμάτων (από τις αναγραφόμενες κορυφές Α, Β, Γ), που προέρχονται από την στήλη HiPrep Sephacryl S-200. Ο συνδυασμός των δύο αυτών σταδίων χρωματογραφίας μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση καθαρής πρωτεΐνης αποΑ-Ι. Οι δείκτες μοριακής μάζας Mr (Μ) που χρησιμοποιήθηκαν είναι: MBP-β-γαλακτοσιδάση: 175 KDa, MBP-παραμυοσίνη: 83 KDa, γλουταμική αφυδρογονάση : 62 KDa, αλδολάση: 47.5 KDa, ισομεράση των φωσφορικών τριοζών: 32.5 KDa, β-γαλακτοσφαιρίνη Α: 25 KDa, λυσοζύμη: 16.5 KDa και απρωτινίνη: 6.5 KDa. Με βέλη σημειώνονται τα κλάσματα με την μεγαλύτερη καθαρότητα ισομορφών της αποΑ-Ι που χρησιμοποιήθηκαν για τις λειτουργικές μελέτες.

Α. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΑΠΟΑ–Ι: Δ(185–243)

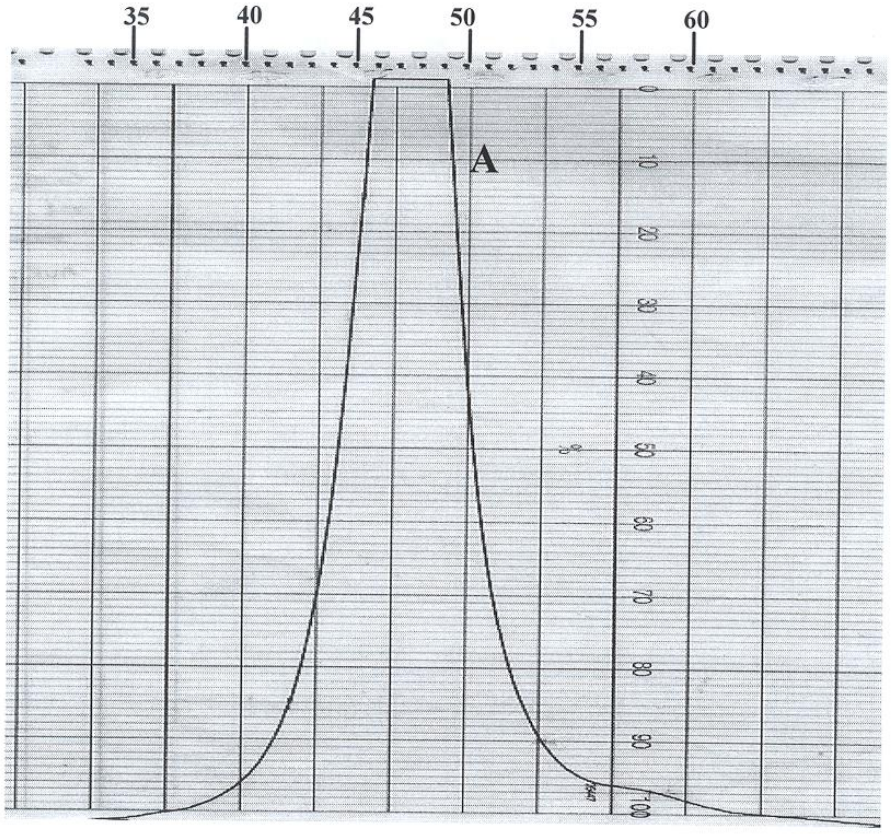


ΚΛΑΣΜΑ #

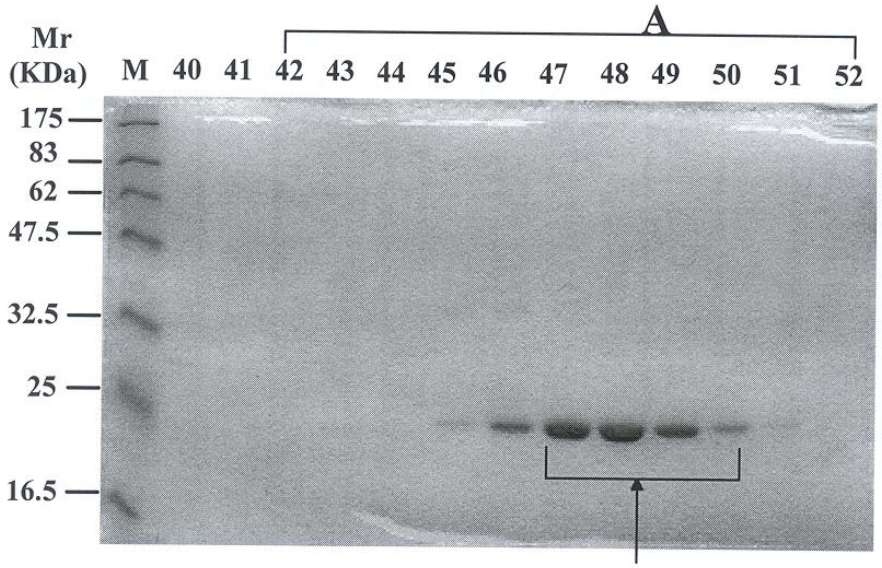


ΚΑΘΑΡΗ ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι

Β. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΑΠΟΑ–Ι: Δ(198–243)

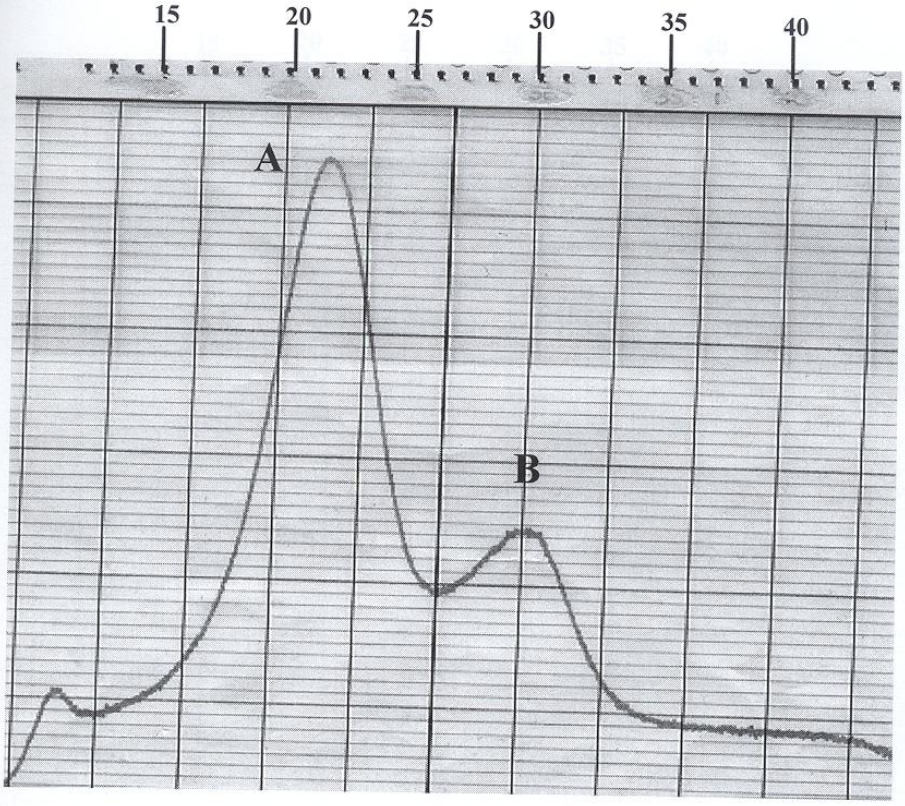


ΚΛΑΣΜΑ #

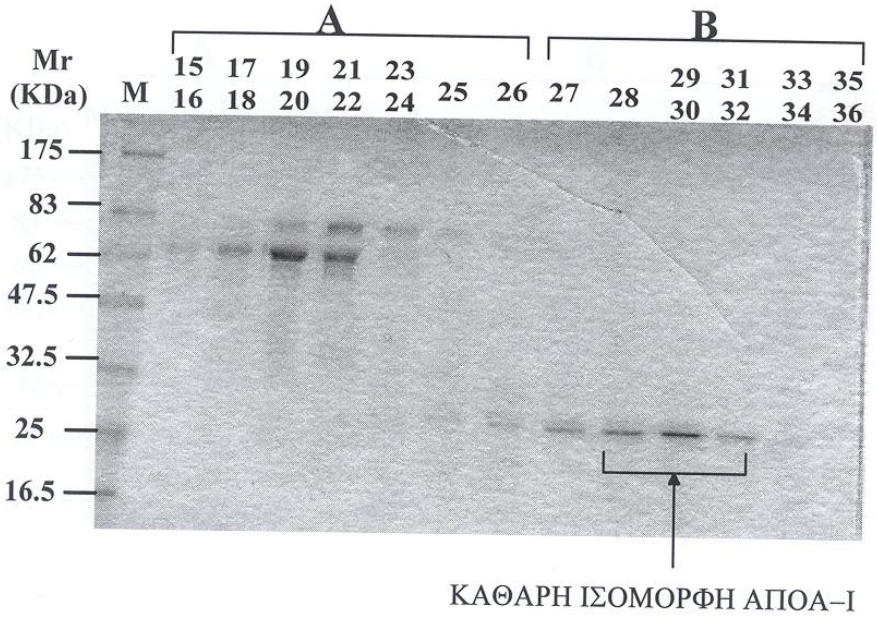


ΚΑΘΑΡΗ ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι

Γ. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΑΠΟΑ–I: Δ(220–243)

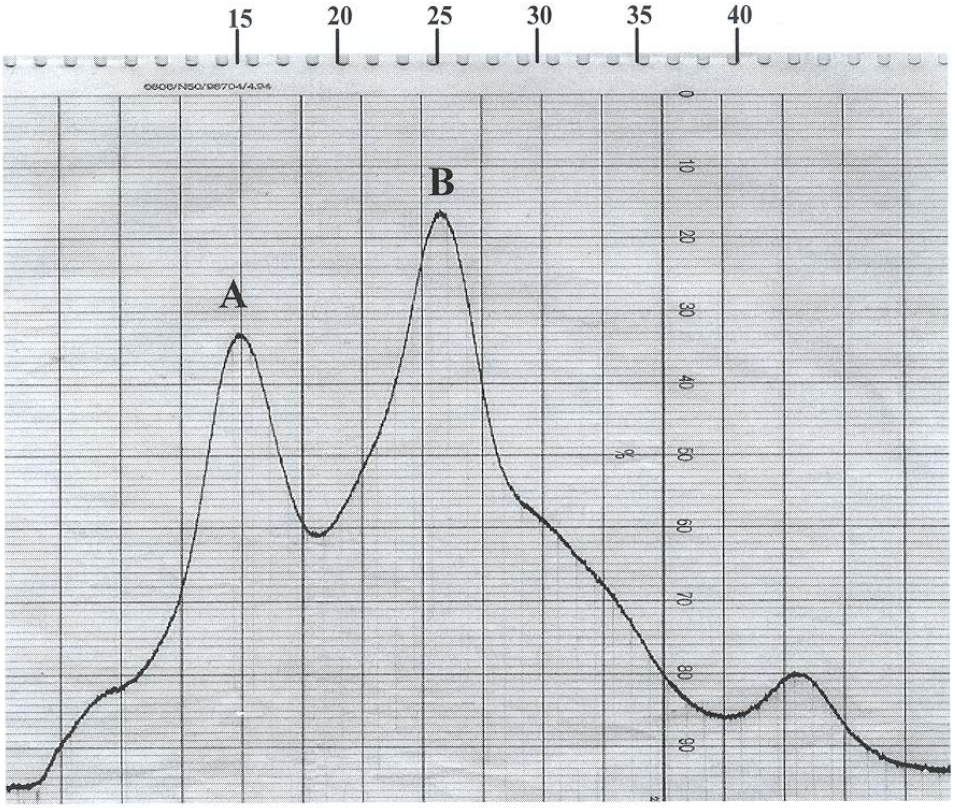


ΚΛΑΣΜΑ #

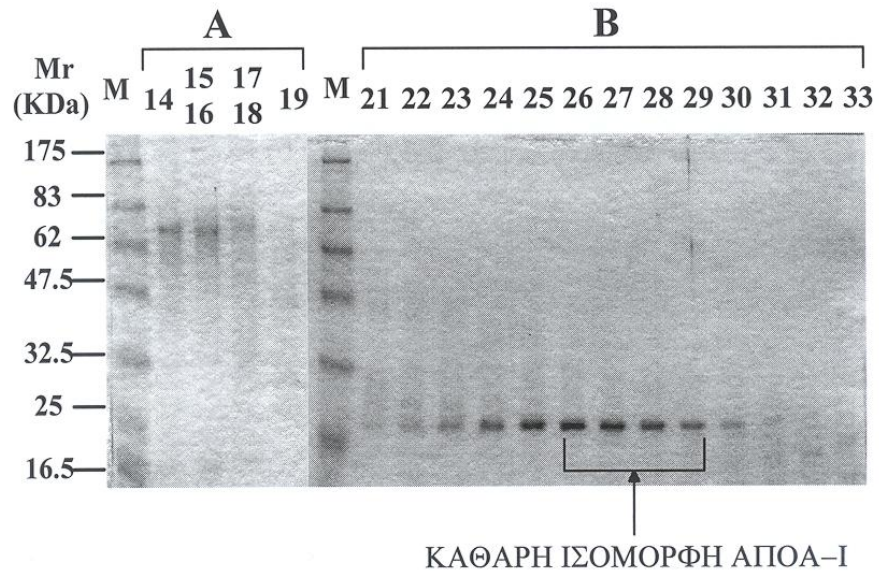


ΚΑΘΑΡΗ ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–I

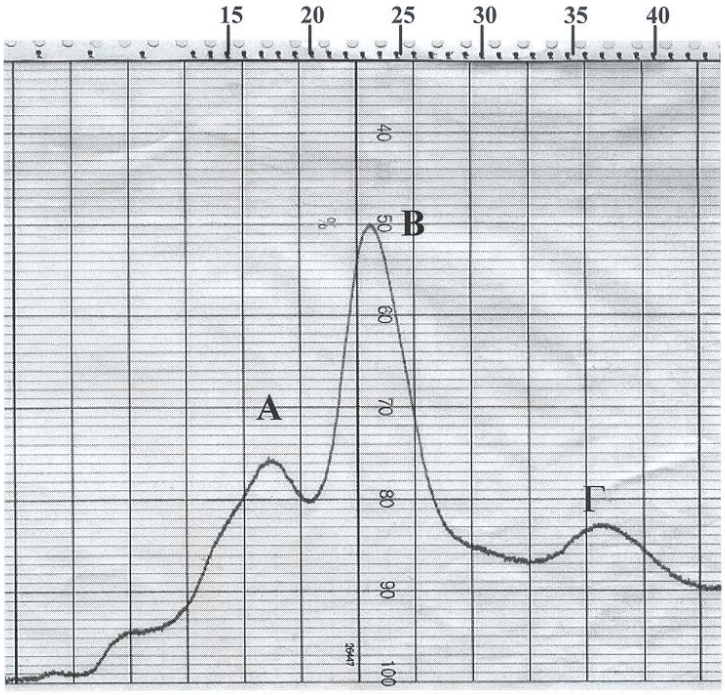
Δ. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΑΠΟΑ–Ι: Δ(232–243)



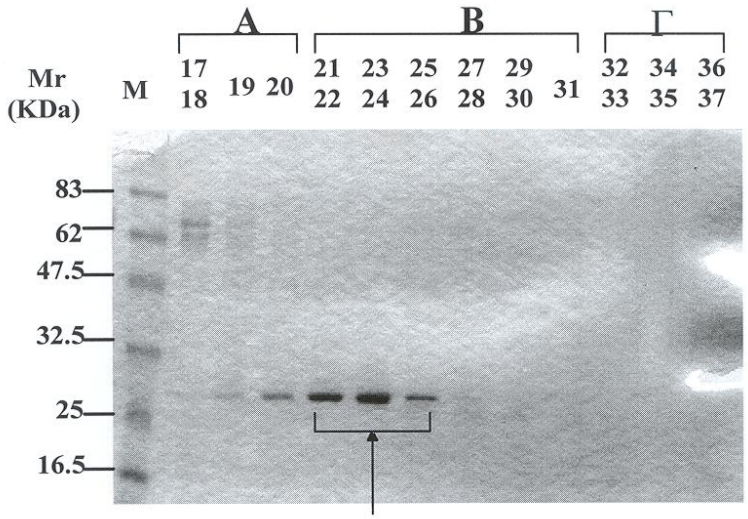
ΚΛΑΣΜΑ #



Ε. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΑΠΟΑ–Ι: (Gly185, 185->Pro 185,186)

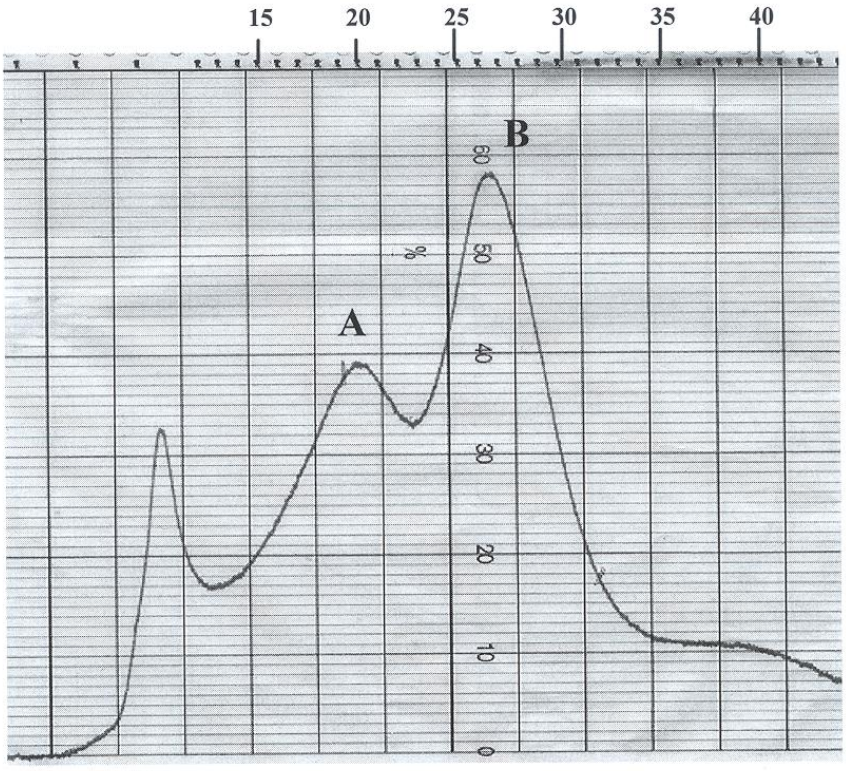


ΚΛΑΣΜΑ #

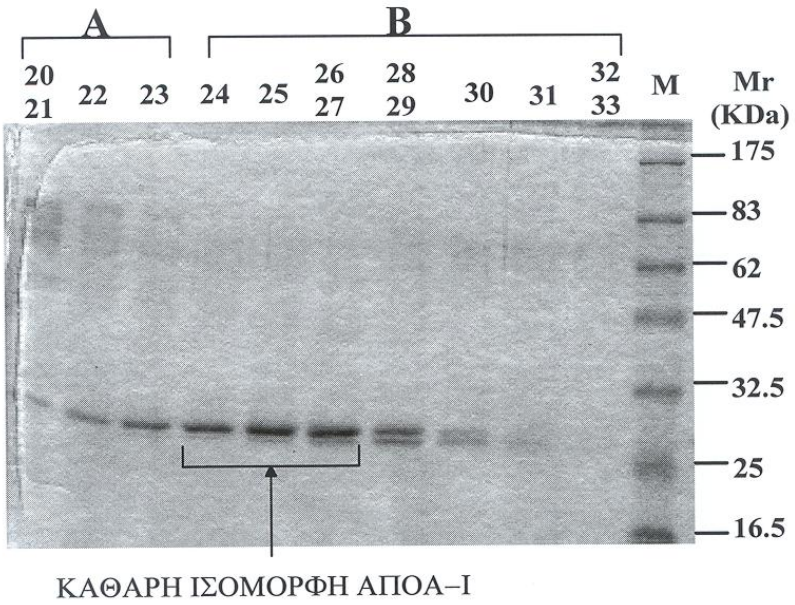


ΚΑΘΑΡΗ ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι

ΣΤ. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΑΠΟΑ–Ι: Δ(187–197)

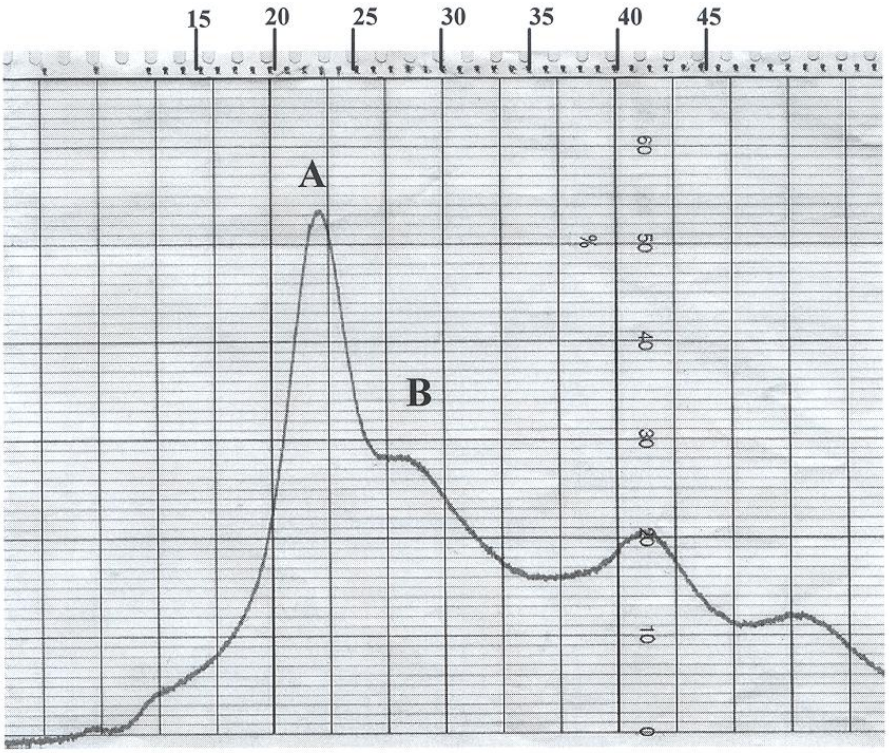


ΚΛΑΣΜΑ #

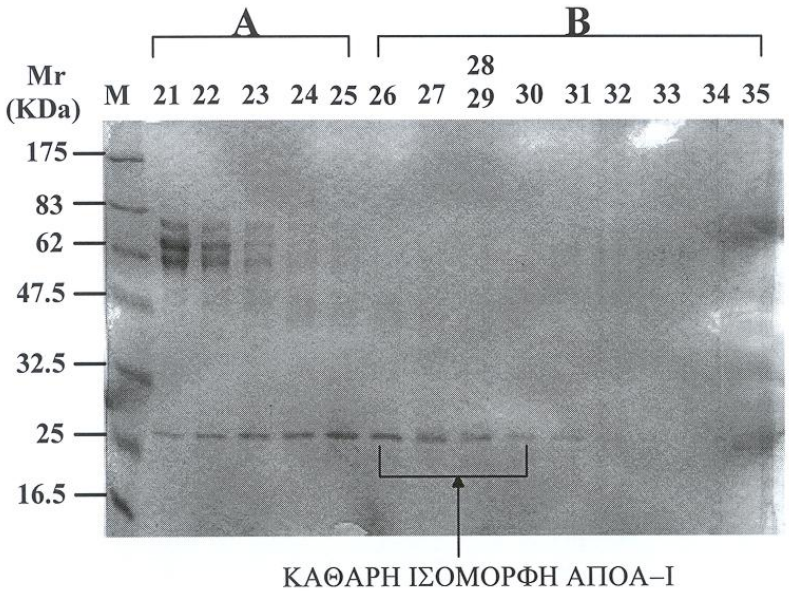


ΚΑΘΑΡΗ ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι

Η. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΑΠΟΑ–Ι: Δ(165–175)

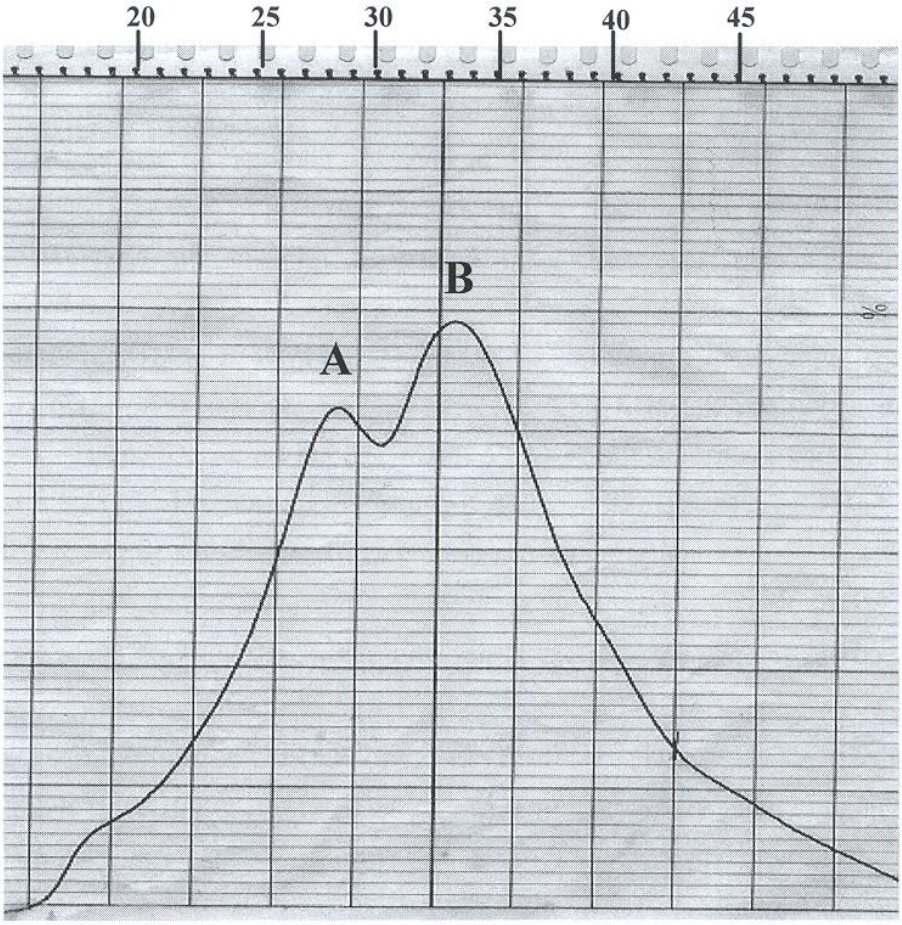


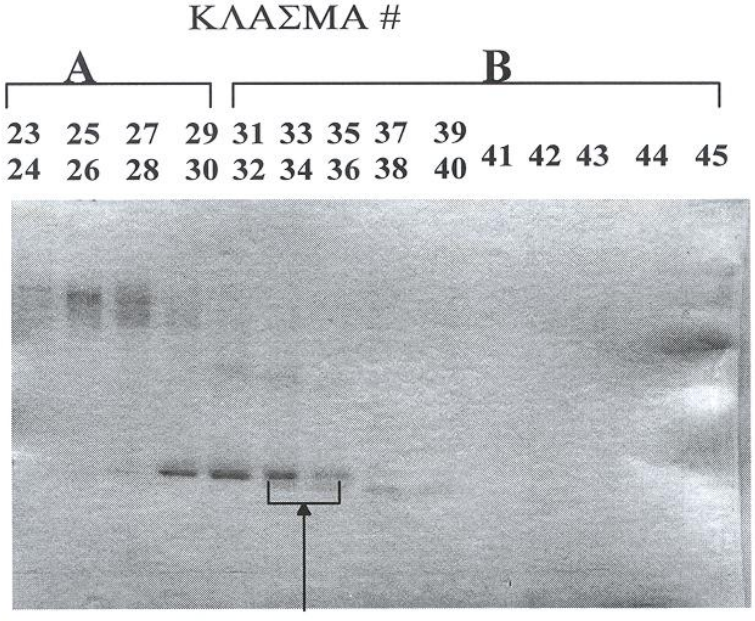
ΚΛΑΣΜΑ #



ΚΑΘΑΡΗ ΙΣΟΜΟΡΦΗ ΑΠΟΑ–Ι

Θ. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΑΠΟΑ–Ι





ΚΑΘΑΡΗ ΑΠΟΑ–Ι

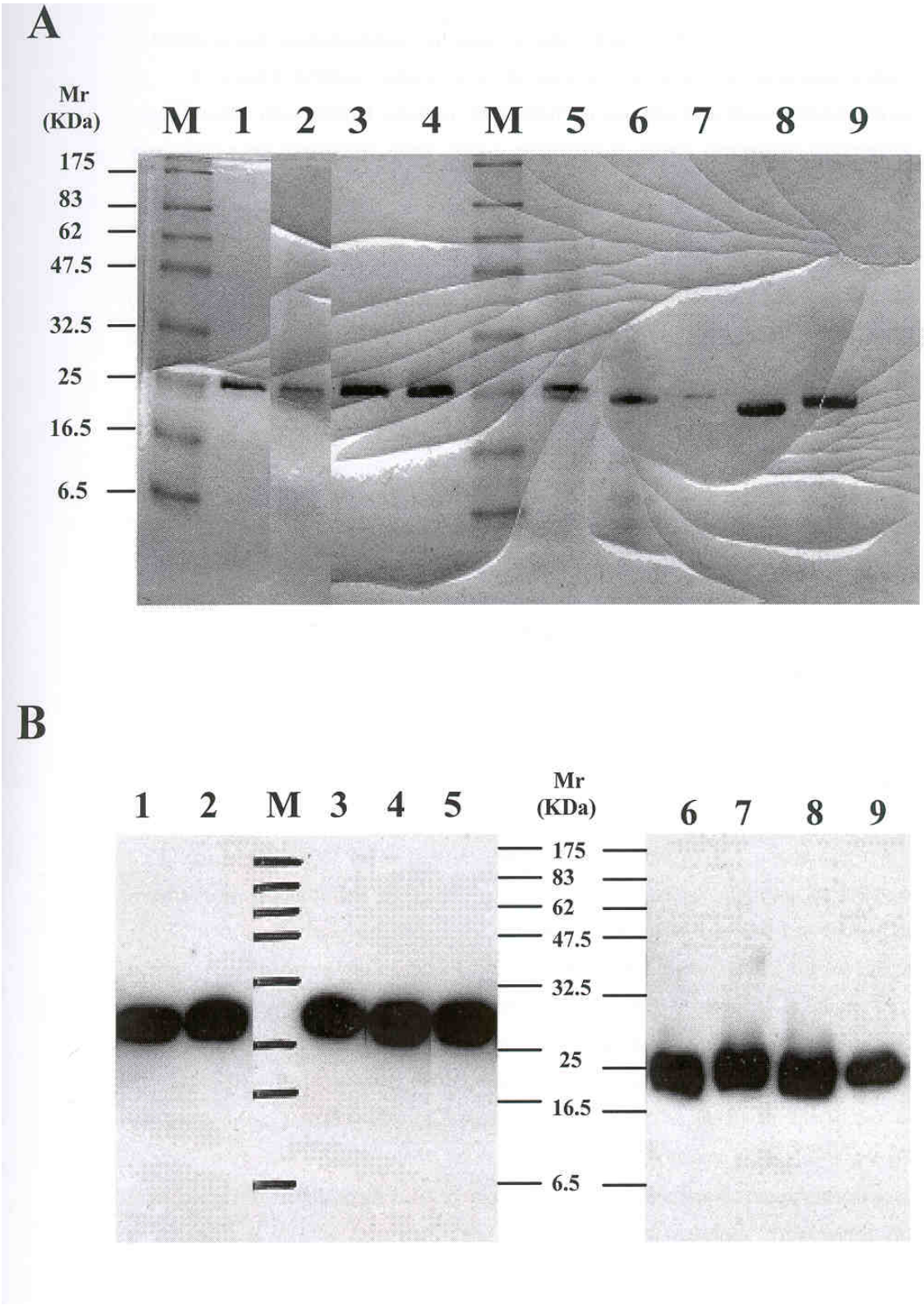
6. Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης και ανοσο-αποτύπωση (western blotting)

Τα κλάσματα του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I που χρησιμοποιήθηκαν για τις περαιτέρω μελέτες υπεβλήθησαν σε 1) ηλεκτροφόρηση σε 15% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS και 2) ανοσο-αποτύπωση.

Το πήκτωμα εχρωματίσθη με Coomassie Brilliant blue, και φαίνεται στην εικόνα 28 (πλαίσιο Α). Σε όλες τις πρωτεΐνες παρατηρείται η εμφάνιση μιας πρωτεϊνικής ζώνης, με μοριακή μάζα που ποικίλλει ανάλογα με την μετάλλαξη. Η μοριακή μάζα είναι περίπου 28 KDa για την αποA-I του πλάσματος, τον φυσικό τύπο αποA-I και την μορφή αποA-I: (G185,G186→P185,P186), 27.5 KDa για τις μορφές αποA-I: Δ(165→175), αποA-I: Δ(187→197) και αποA-I: Δ(232→243), 23.5 KDa για την μορφή αποA-I: Δ(198→243), 26 KDa για την μορφή αποA-I: Δ(220→243), και περίπου 22 KDa για την αποA-I: Δ(185→243). Οι μοριακές μάζες των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, όπως εκτιμώνται από τα πηκτώματα είναι σε συμφωνία με αυτές που προβλέπονται από τις αντίστοιχες μεταλλάξεις που φέρουν. Η ποσότητα της πρωτεΐνης αποA-I: Δ(232→243) που αναλύθηκε ήταν μικρότερη, και αυτό εξηγεί την μειωμένη ένταση της ζώνης της σειράς 7 στην εικόνα 28 (πλαίσιο Α).

Μικρές ποσότητες (500 ng- 1 μg) των πρωτεϊνών επίσης αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωση. Για αυτή την ανάλυση, μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επωάσθηκαν αρχικά με μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στην ανθρώπινη αποA-I (από ποντίκι) και στη συνέχεια με αντίσωμα ενάντια στην IgG του ποντικού συνδεδεμένο με υπεροξειδάση. Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με έκθεση της μεμβράνης σε αντιδραστήριο ενισχυμένου χημειοφθορισμού (ECL) και αυτοραδιογραφία. Η εικόνα 28 (πλαίσιο Β) δείχνει το αποτέλεσμα της ανοσο-αποτύπωσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Σε συμφωνία με την εικόνα 28 (πλαίσιο Α) παρατηρείται για κάθε μετάλλαξη η εμφάνιση μιας πρωτεϊνικής ζώνης, με μοριακή μάζα που ποικίλλει ανάλογα με την μετάλλαξη. Οι μοριακές μάζες των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών είναι σε συμφωνία με αυτές που προβλέπονται από τις αντίστοιχες μεταλλάξεις.

ΕΙΚΟΝΑ 28. Πλαίσιο Α. Ανάλυση του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS. Οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύθησαν μετά από χρωματισμό του πηκτώματος με χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Οι σειρές 1-9 περιέχουν: 1) φυσικός τύπος αποA-I, 2) Μορφή αποA-I: Δ(165→175), 3) αποA-I πλάσματος, 4) Μορφή αποA-I: (G185,G186→P185,P186), 5) Μορφή αποA-I: Δ(187→197), 6) Μορφή αποA-I: Δ(220→243), 7) Μορφή αποA-I: Δ(232→243), 8) Μορφή αποA-I: Δ(185→243) και 9) Μορφή αποA-I: Δ(198→243). **Πλαίσιο Β: Αυτοραδιογράφημα του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I μετά από μεταφορά σε μεβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσο-αποτύπωση (western blotting).** Ποσότητες 500 ng-1 μg κάθε πρωτεΐνης αναλύθηκαν σε 15% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και υπεβλήθησαν σε υβριδοποίηση με μονοκλωνικό αντίσωμα για την ανθρώπινη αποA-I. Οι σειρές 1-9 περιέχουν : 1) αποA-I πλάσματος, 2) φυσικός τύπος αποA-I, 3) Μορφή αποA-I: (G185,G186→>P185,P186), 4) Μορφή αποA-I: Δ(187→197), 5) Μορφή αποA-I: Δ(165→175), 6) Μορφή αποA-I: Δ(220→243), 7) Μορφή αποA-I: Δ(232→243), 8) Μορφή αποA-I: Δ(185→243) και 9) Μορφή αποA-I: Δ(198→243). Με Μ σημειώνονται οι δείκτες μοριακής μάζας (MBP-β-γαλακτοσιδάση: 175 KDa, MBP-παραμυοσίνη: 83 KDa, γλουταμική αφυδρογονάση: 62 KDa, αλδολάση: 47.5 KDa, ισομεράση των φωσφορικών τριοζών: 32.5 KDa, β-γαλακτοσφαιρίνη Α: 25 KDa, λυσοζύμη: 16.5 KDa και απρωτινίνη: 6.5 KDa).


A
Mr
(KDa)
M 1 2 3 4 M 5 6 7 8 9
175
83
62
47.5
32.5
25
16.5
6.5
B
1 2 M 3 4 5
Mr
(KDa)
6 7 8 9
175
83
62
47.5
32.5
25
16.5
6.5

7. Σύνδεση των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με λιπίδια

Η αποA-I αντιδρά αυθόρμητα με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων (multilamellar phospholipid vesicles), όπως DMPC (διμυριστοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη). Αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι ο σχηματισμός μικρών δισκοειδών σωματιδίων που είναι ορατά μετά από αρνητική χρώση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (136). Τα σωματίδια αυτά έχουν διάμετρο 150 Å, όπως προκύπτει από πειράματα σκέδασης ακτίνων Χ (133), όταν χρησιμοποιείται αναλογία DMPC : πρωτεΐνης 2.5:1 (βάρος/βάρος), και χαρακτηρίζονται από διαφορετικές ιδιότητες σκέδασης φωτός συγκρινόμενα με τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα που έχουν ακτίνες μεγαλύτερες από 1000 Å. Τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC εμφανίζονται ως γαλακτώδες αιώρημα, το οποίο γίνεται διαυγές με την προσθήκη του φυσικού τύπου της αποA-I.

Τα πειράματα σύνδεσης της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC έγιναν με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I στην κινητική της αλληλεπίδρασης της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων. Η ταχύτητα της αλληλεπίδρασης καταγράφεται με την αλλαγή της απορρόφησης του αιωρήματος σε 325 nm, που είναι το αποτέλεσμα της μετατροπής των πολυμεμβρανικών λιποσωμάτων σε διπλοστοιβάδες που έχουν την μορφή δισκοειδών σωματιδίων. Τα πειράματα έγιναν σε θερμοκρασία 24^{o} C, η οποία αποτελεί την μεταβατική φάση για το λιπίδιο DMPC. Στην θερμοκρασία αυτή συνυπάρχουν οι φάσεις του πηκτώματος και η υγρή-κρυσταλλική φάση, και οι ατέλειες (defects) στην πολυμεμβρανική στοιβάδα διευκολύνουν την αλληλεπίδραση με την αποA-I.

Στην εικόνα 29 (πλαίσια Α-Θ) φαίνεται ότι η αποA-I του πλάσματος και ο ανασυνδυασμένος φυσικός τύπος αποA-I συνδέονται με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC και τα διαλυτοποιούν πολύ γρήγορα, όπως δηλώνεται από την δραματική μείωση στην θολότητα του αιωρήματος DMPC. Αντίθετα οι μεταλλάξεις της αποA-I οι οποίες απαλοίφουν καρβοξυτελικά τμήματα της πρωτεΐνης (εικόνα 27, πλαίσια Α-Δ) φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν πολύ αργά με τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου. Είναι εμφανές από τις εικόνες ότι το αιώρημα του φωσφολιπιδίου δεν γίνεται διαυγές. Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις αυτές στις οποίες έχουν απαλοιφεί: οι έλικες 7-10 (αποA-I: Δ(185→243)) (πλαίσιο Α), ή μέρος της έλικας 8 και οι έλικες 9-10, (αποA-I: Δ(198→243) (πλαίσιο Β), ή η περιοχή τυχαίου σπειράματος μεταξύ των ελίκων 9 και 10 και όλη η έλικα 10, (αποA-I: Δ(220→243) (πλαίσιο Δ) φαίνεται ότι

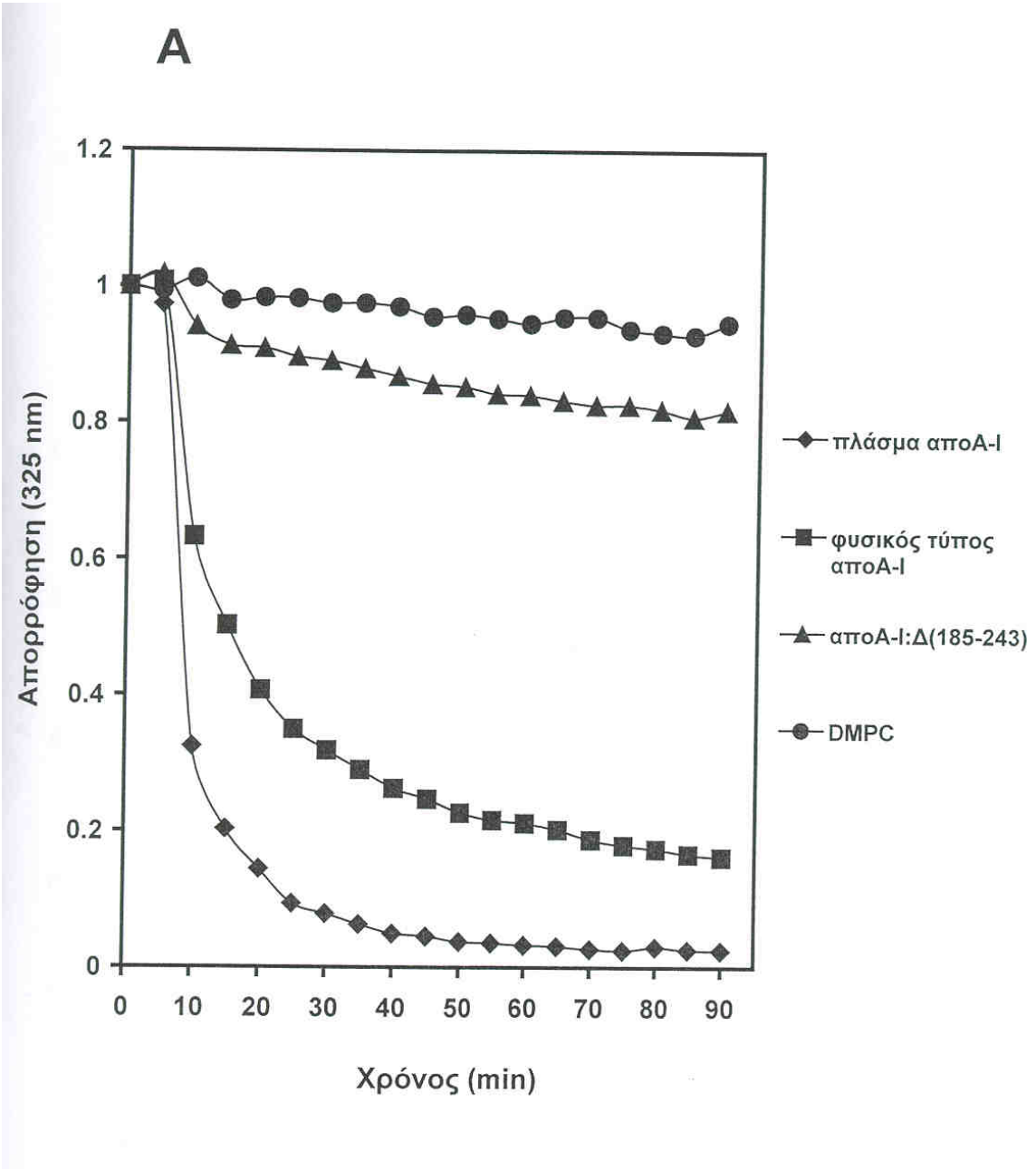
αλληλεπιδρούν πολύ αργά με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη και αν διπλασιασθεί η αναλογία βάρους πρωτεΐνης-λιπιδίου (2.5: 2, DMPC: (αποA-I: Δ(198→243)) η ταχύτητα διαλυτοποίησης των λιποσωμάτων του DMPC παραμένει εξαιρετικά αργή (πλαίσιο Γ). Η μετάλλαξη της αποA-I στην οποία έχει απαλοιφεί ένα μικρότερο μέρος της έλικας 10, αποA-I: Δ(232→243), φαίνεται ότι αλληλεπιδρά πιο γρήγορα και διαλυτοποιεί τα λιποσώματα του DMPC, αλλά η ταχύτητα είναι εξαιρετικά αργή συγκριτικά με την αποA-I του πλάσματος και τον φυσικό τύπο αποA-I (πλαίσιο Ε).

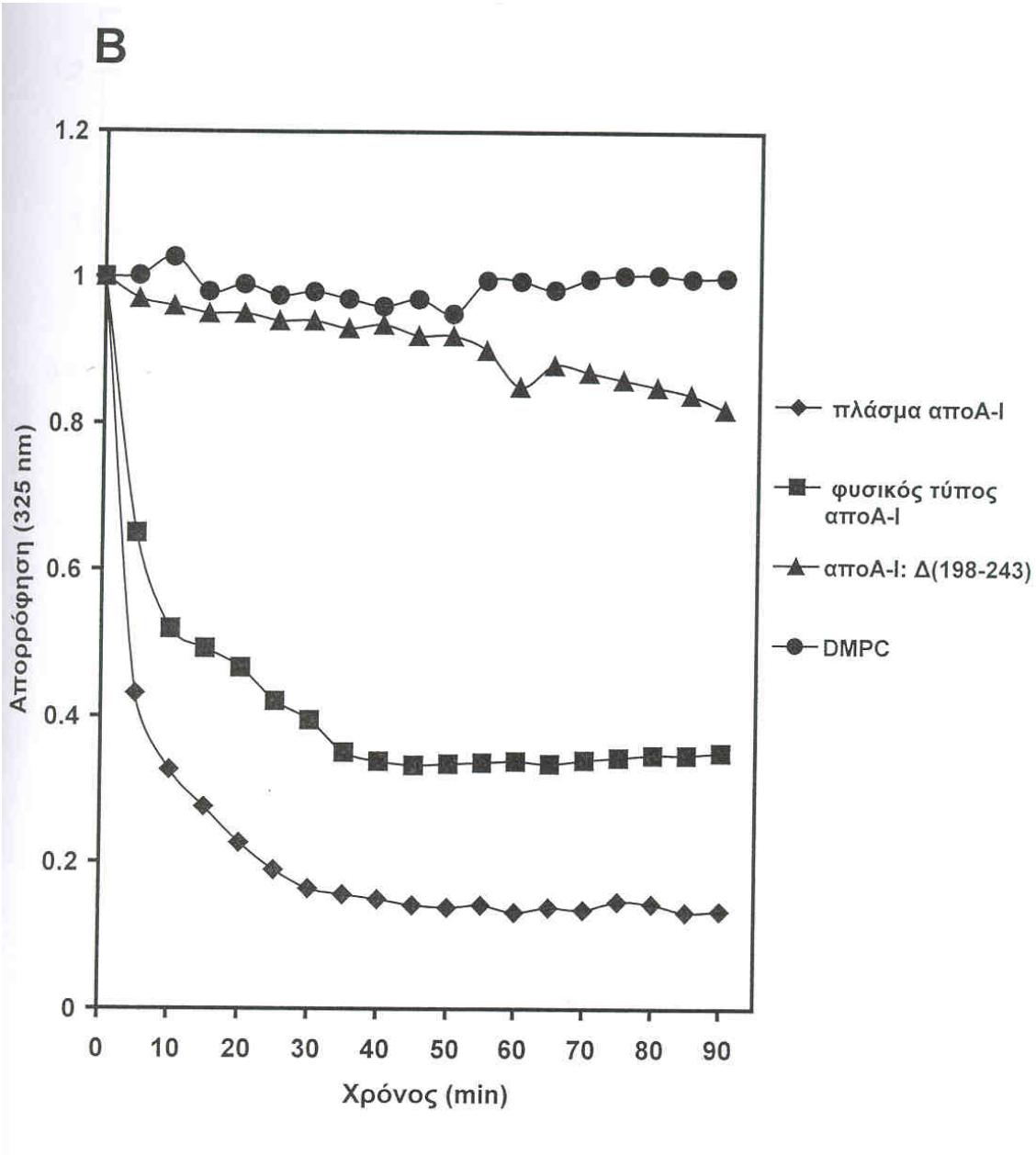
Την ίδια συμπεριφορά με τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I που φέρουν τις καρβοξυτελικές απαλοιφές φαίνεται να έχει και η μετάλλαξη στην οποία έχει απαλοιφεί η μισή έλικα 7 (αποA-I: Δ(165→175)), δηλαδή πολύ αργή αλληλεπίδραση με τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC, όπως φαίνεται από την μεταβολή στην απορρόφηση στα 325 nm (πλαίσιο ΣΤ). Αντίθετα η μεταλλαγμένη μορφή στην οποία έχει απαλοιφεί μέρος της έλικας 8 (αποA-I: Δ(187→197)) (πλαίσιο Η) φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC με ταχύτητα μικρότερη συγκριτικά με την αποA-I του πλάσματος και τον φυσικό τύπο της αποA-I, αλλά μεγαλύτερη συγκριτικά με τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: Δ(185→243), αποA-I: Δ(198→243) και αποA-I: Δ(220→243) (πλαίσια Α, Β, Δ αντίστοιχα).

Αντίθετα άλλες μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν την ικανότητα της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά και να διαλυτοποιεί τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC. Για παράδειγμα η εικόνα 29, πλαίσιο Θ δείχνει ότι η κινητική αλληλεπίδρασης της αποA-I στην οποία οι δύο γλυκίνες στις θέσεις 185 και 186 έχουν αντικατασταθεί από προλίνες με τα λιποσώματα του DMPC είναι παρόμοια με αυτήν της αποA-I του πλάσματος και λίγο μεγαλύτερη από αυτήν του ανασυνδυασμένου φυσικού τύπου αποA-I.

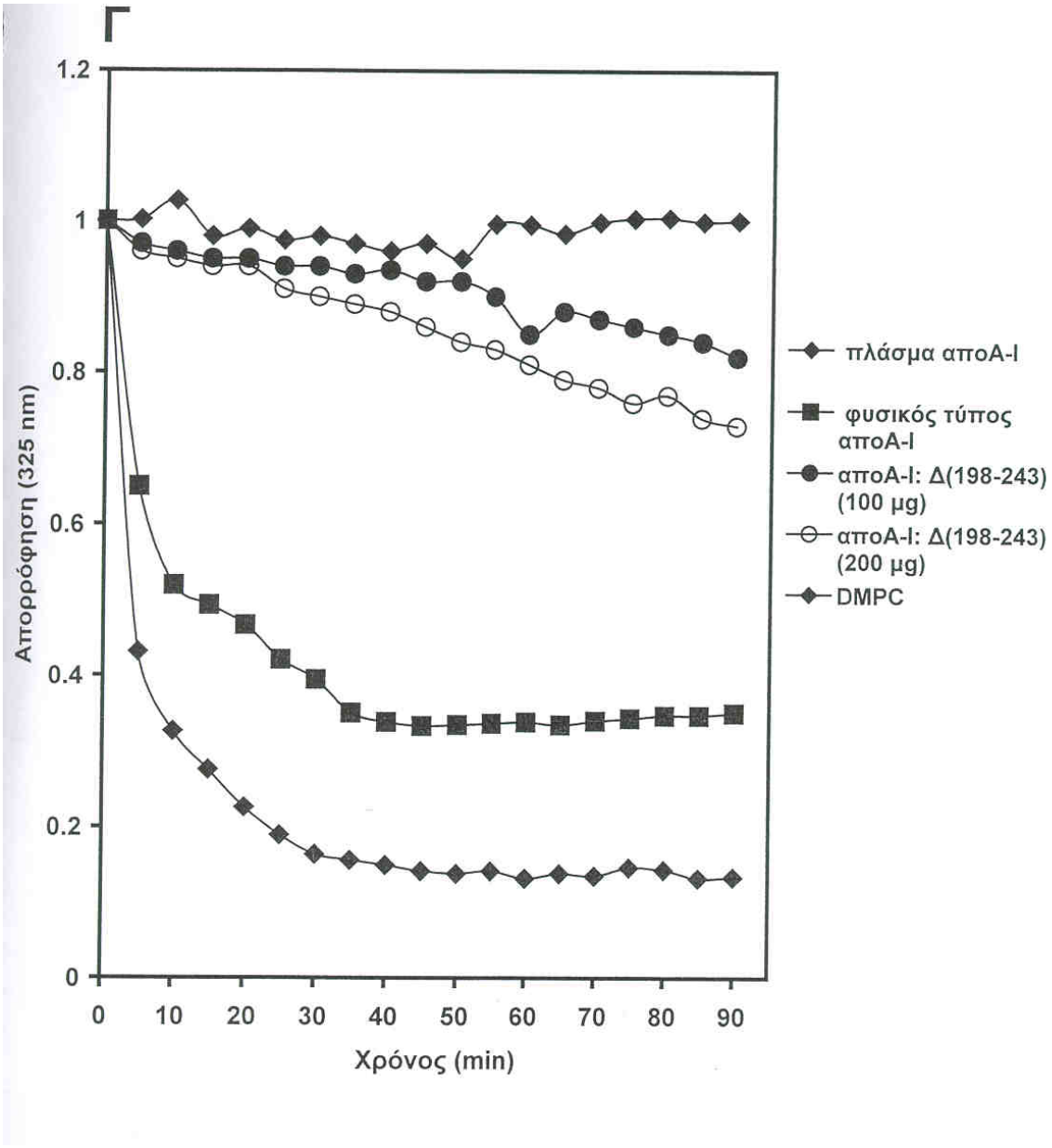
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν καθαρά ότι το καρβοξυτελικό άκρο της αποA-I είναι σημαντικό για την σύνδεση με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων. Είναι ενδιαφέρον ότι η απαλοιφή 10 αμινοξέων της κεντρικής έλικας 7 φαίνεται να επηρεάζει δραστικά την ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά και να διαλυτοποιεί τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC.

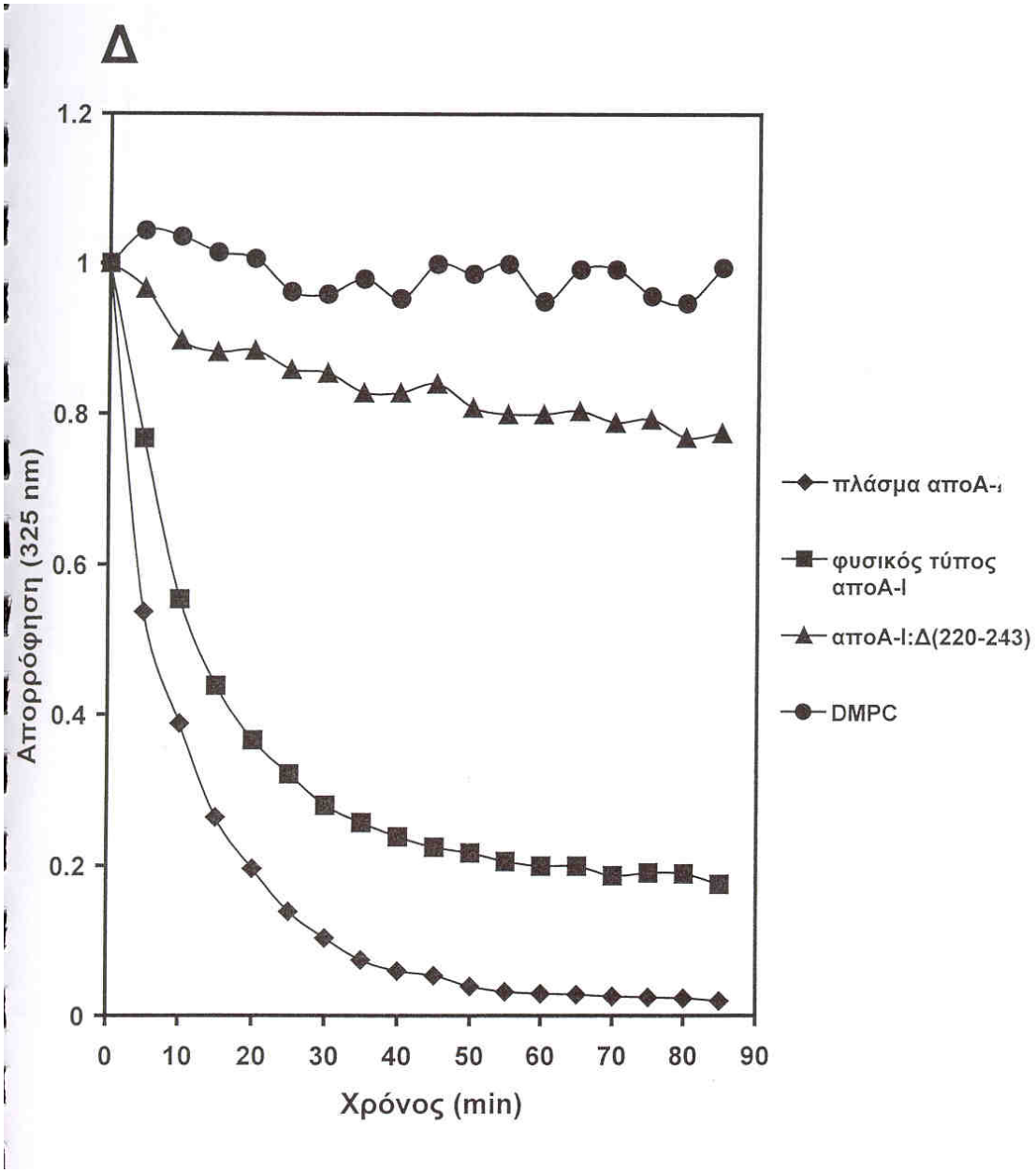
ΕΙΚΟΝΑ 29 (Α-Θ). Διαλυτοποίηση πολυμεμβρανικών λιποσωμάτων του φωσφολιπιδίου DMPC από τον φυσικό τύπο και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, όπως καταγράφεται με την αλλαγή της θολότητας του αιωρήματος σε 24^{o} C, που οδηγεί στην μείωση της απορρόφησης στα 325 nm συναρτήσει του χρόνου. Πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC αλληλεπέδρασαν με τον φυσικό τύπο αποA-I ή τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, σε αναλογία DMPC: αποA-I (2.5: 1, βάρος: βάρος). Η αλλαγή στην θολότητα κατεφράφη με αλλαγή της απορρόφησης σε 325 nm, με διαλλείματα 5 λεπτών, και παριστάνεται διαγραμματικά συναρτήσει του χρόνου. Πλαίσιο Α: Μορφή αποA-I: Δ(185→243), Πλαίσια Β, Γ: Μορφή αποA-I: Δ(198→243), Πλαίσιο Δ: Μορφή αποA-I: Δ(220→243), Πλαίσιο Ε: Μορφή αποA-I: Δ(232→243), Πλαίσιο ΣΤ: Μορφή αποA-I: Δ(165→175), Πλαίσιο Η: Μορφή αποA-I: Δ(187→197) και Πλαίσιο Θ: Μορφή αποA-I: (G185, G186 →P185,P186).

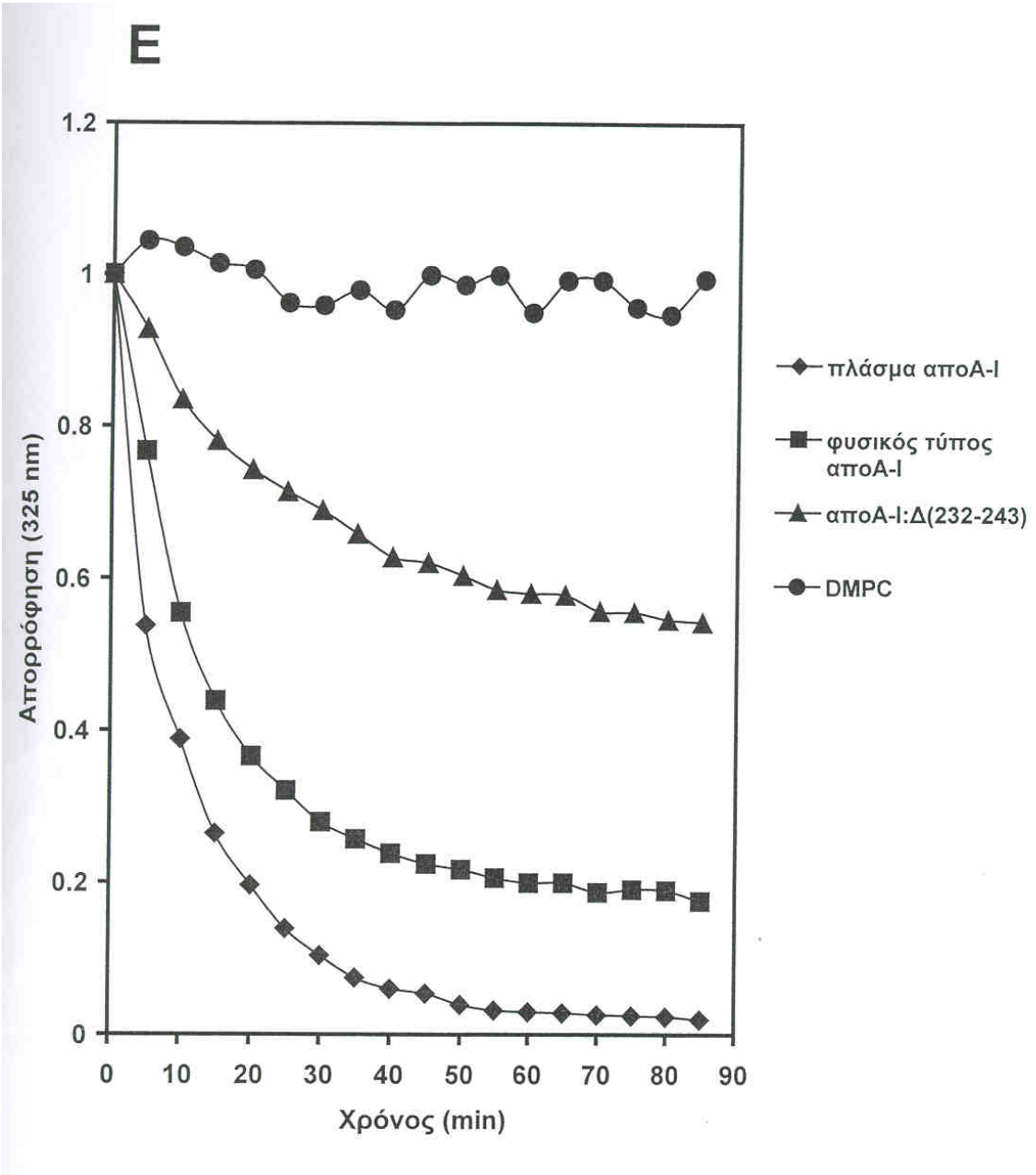

A
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I:Δ(185-243)
DMPC

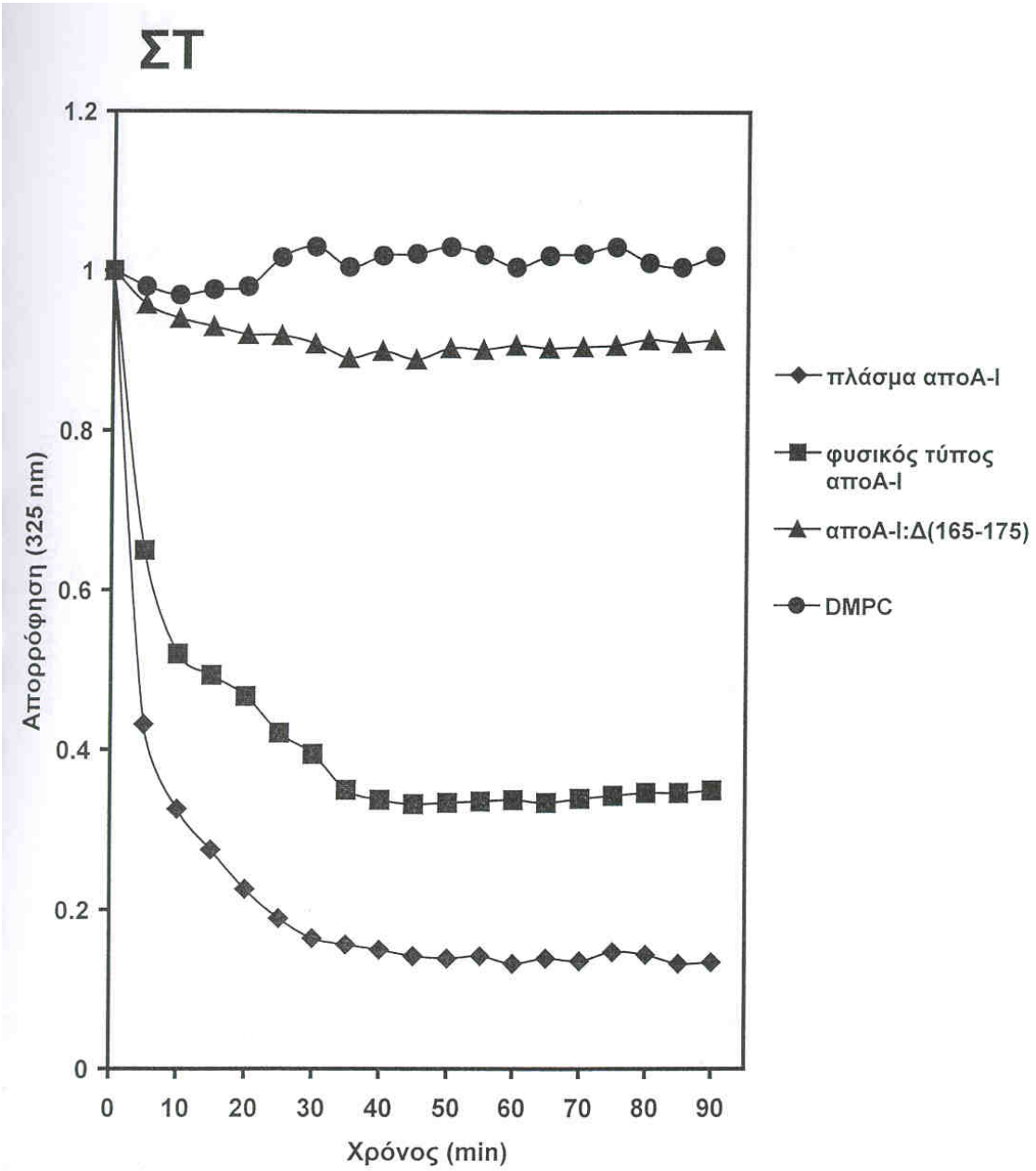

B
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I: Δ(198-243)
DMPC

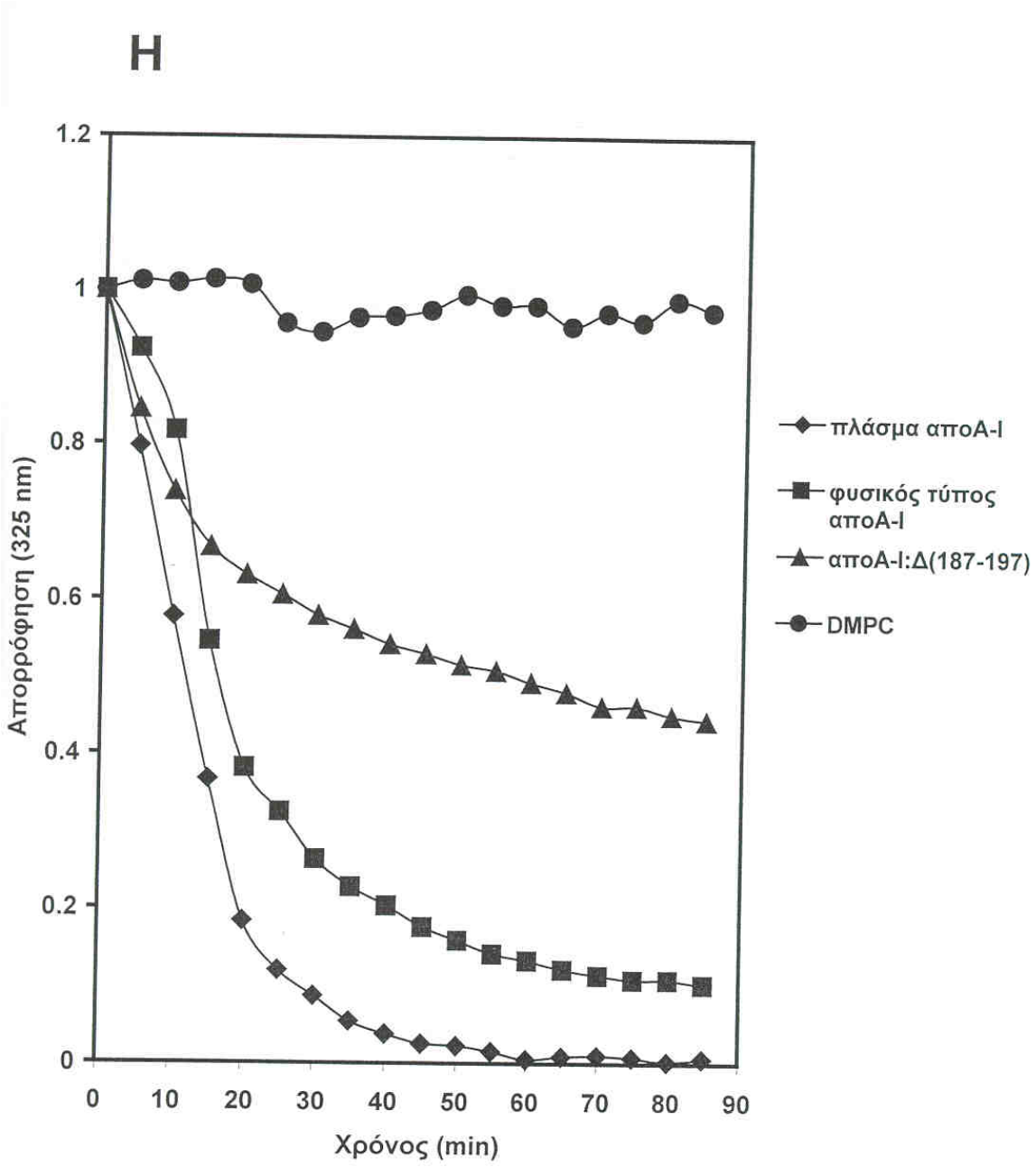
Γ

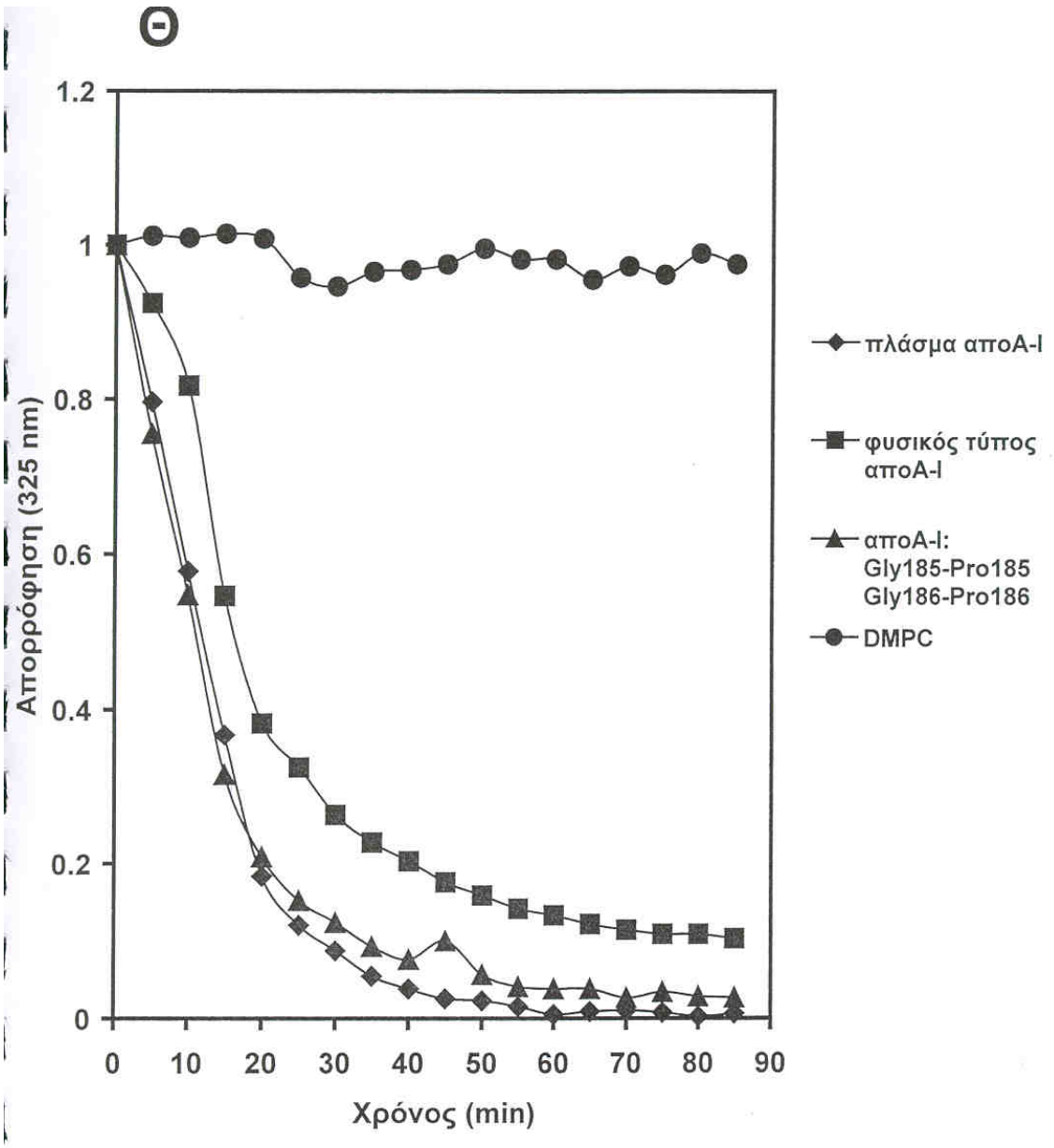

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I: Δ(198-243) (100 μg)
αποA-I: Δ(198-243) (200 μg)
DMPC


Δ
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I:Δ(220-243)
DMPC


E
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I:Δ(232-243)
DMPC


ΣΤ
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I:Δ(165-175)
DMPC


H
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I:Δ(187-197)
DMPC


Θ
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Απορρόφηση (325 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Χρόνος (min)
πλάσμα αποA-I
φυσικός τύπος αποA-I
αποA-I: Gly185-Pro185 Gly186-Pro186
DMPC

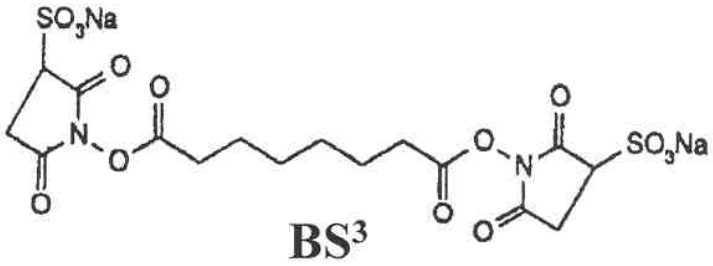
8. Σχηματισμός ολιγομερών από τον φυσικό τύπο και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I

Η σύνδεση με τα λιπίδια στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών αποτελεί το ιδανικό περιβάλλον για την αποA-I. Όταν η αποA-I βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα οι περιοχές της πρωτεΐνης που συνήθως συνδέονται με τα λιπίδια στην λιποπρωτεϊνική επιφάνεια, εκτίθενται στο υδατικό περιβάλλον. Έτσι η αποA-I, ελεύθερη σε διάλυμα, εμφανίζει την τάση αυτοένωσης που οδηγεί σε σχηματισμό ολιγομερών, που συνήθως συνίσταται από 2, 3 ή 4 μόρια αποA-I. Ο σχηματισμός ολιγομερών εξαρτάται από την συγκέντρωση της αποA-I στο διάλυμα.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η αποA-I σχηματίζει διμερή σε συγκέντρωση 0.1 mg/ml (369, 370). Επιπλέον μελέτες διασύνδεσης (cross-linking) από τους Swany και O' Brien (371) έδειξαν ότι η αποA-I σχηματίζει ολιγομερή σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0.5 mg/ml. Ο σχηματισμός ολιγομερών από την αποA-I σε διάλυμα, σε υψηλές συγκεντρώσεις αποτελεί βασικό πρόβλημα για την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.

Για να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά ολιγομερισμού των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, σε σύγκριση με τον φυσικό τύπο της πρωτεΐνης, έγιναν πειράματα διασύνδεσης χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο BS^3 (δις σουλφοσουκινιμιδυλο σουβερικό)) ([Bis(sulfosuccinimidyl suberate]). Το BS^3 είναι υδατοδιαλυτός ομοδιλειτουργικός εστέρας N-υδροξυλο-σουξυμιδίου, (NHS-ester) ο οποίος μπορεί να αλληλεπιδράσει με πρωτοταγείς αμίνες. Βασικά η ε-αμινομάδα του αμινοξέος λυσίνη αντιδρά με τον εστέρα και σχηματίζει ομοιοπολικό αμιδικό δεσμό, όπως φαίνεται στην εικόνα 30.

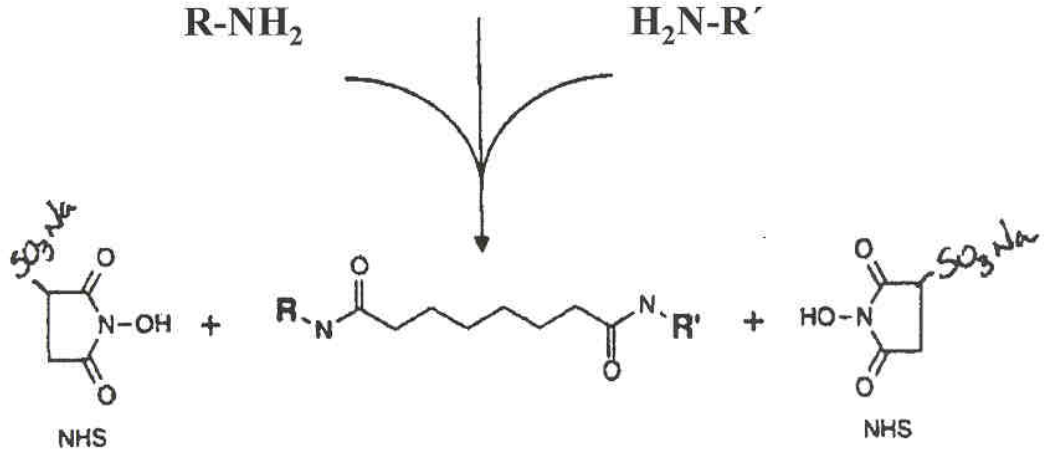
ΕΙΚΟΝΑ 30: Χημική αντίδραση μεταξύ του αντιδραστηρίου BS^3 και των ε-αμινομάδων των λυσίνων. Το BS^3 (δις σουλφοσουξινιμιδυλο-σουβερικό) μπορεί να αντιδράσει με δύο μόρια που περιέχουν αμινομάδες με αποτέλεσμα την διασύνδεση των αμιδικών δεσμών. Ο αμιδικός δεσμός που δημιουργείται είναι σταθερός.



BS³

Υδατοδιαλυτό

MW 572.43



Η εικόνα 31 δείχνει ότι η αποA-I από το πλάσμα σχηματίζει διμερή, τριμερή και τετραμερή, παράλληλα με τα μονομερή, όταν η συγκέντρωσή της σε διάλυμα είναι 1.5 mg/ml (σειρές 1, 6, 11). Η αλλαγή των αμινοξέων γλυκίνη στις θέσεις 185 και 186 με προλίνη (αποA-I: G185,G186→P185,P186), καθώς και η απαλοιφή των αμινοξέων 232-243 (αποA-I: Δ(232→243)) δεν επηρεάζουν την ικανότητα ολιγομερισμού των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, όπως φαίνεται από την εικόνα 31 (σειρές 12 και 10 αντίστοιχα). Τα τριμερή και τα τετραμερή που σχηματίζονται είναι ποσοτικά συγκρίσιμα με αυτά της αποA-I του πλάσματος.

Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I στις οποίες έχουν απαλοιφεί μέρη της κεντρικής περιοχής, όπως αποA-I: Δ(187→197) (σειρά 2) και αποA-I: Δ(165→175) (σειρά 7), καθώς και οι μορφές της αποA-I, στις οποίες έχουν απαλοιφεί μεγαλύτερα μέρη της καρβοξυτελικής περιοχής, αποA-I: Δ(185→243) (σειρές 8 και 9), αποA-I: Δ(198→243) (σειρά 5) και αποA-I: Δ(220→243) (σειρές 3 και 4) διατηρούν την ικανότητα σχηματισμού διμερών, σε συγκέντρωση 1.5 mg/ml, αλλά σχηματίζουν πολύ μικρές ποσότητες τριμερών και τετραμερών. Συνολικά η ικανότητα σχηματισμού διμερών και κυρίως ο σχηματισμός ανώτερης τάξης ολιγομερών (τριμερών και τετραμερών) από τις μεταλλαγές της αποA-I που επεκτείνονται έως και το αμινοξύ 220 είναι μειωμένος συγκριτικά με την αποA-I του πλάσματος.

Τα πειράματα διασύνδεσης φανερώνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό ολιγομερών της πρωτεΐνης σε διάλυμα.

ΕΙΚΟΝΑ 31. Διασύνδεση του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, όπως φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS. Η αποA-I του πλάσματος και οι διάφορες μορφές της αποA-I επωάσθηκαν με BS^3 και αναλύθηκαν σε 8-25% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (phast gel, Pharmacia). Οι σειρές 1-12 περιέχουν: 1, 6, 11: αποA-I πλάσματος, 2: αποA-I: Δ(187→197), 3, 4: αποA-I: Δ(220→243), 5: αποA-I: Δ(198→243), 7: αποA-I: Δ(165→175), 8, 9: αποA-I: Δ(185→243), 10: αποA-I: Δ(232→243), 12: αποA-I: (G185,G186→P185,P186). Η ύπαρξη μικροτέρων ποσοτήτων της αποA-I: Δ(232→243) οφείλεται στην ηλεκτροφορητική ανάλυση λιγότερης ποσότητας δείγματος.

Μονομερή
Δυμερή
Τετραμερή
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
AI πλάσματος
AI: Δ(187-197)
AI: Δ(220-243)
AI: Δ(220-243)
AI: Δ(198-243)
AI πλάσματος
AI: Δ(165-175)
AI: Δ (185-243)
AI: Δ (185-243)
AI: Δ(232-243)
AI πλάσματος
AI: G185-P,G186-P

9. Ανάλυση των σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL) των μορφών της αποA-I με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.

Τα σωματίδια rHDL που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου χρωματίστηκαν με αρνητική χρώση με φωσφοτουκστενικό κάλιο (potassium phosphotungstate). Η μέθοδος αυτή παρέχει μια πολύ ισχυρή χρώση ηλεκτρονίων και χρησιμοποιείται συχνά για την χρώση των λιποπρωτεϊνών. Τα δείγματα αυτά τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες επικαλλυμένες με άνθρακα και φωτογραφήθηκαν με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου Philips CM12.

Η εικόνα 32 (A-I) δείχνει τα ηλεκτρονικά μικρογραφήματα των σωματιδίων rHDL που περιέχουν την αποA-I από το πλάσμα, τον ανασυνδυασμένο φυσικό τύπο και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Υπό τις συνθήκες της αρνητικής χρώσης που χρησιμοποιήθηκαν τα σωματίδια σχηματίζουν επιμήκεις κυλίνδρους (τυπικό "rouleaux"), που προέρχονται από την συνένωση πολλών δισκοειδών σωματιδίων σε σχήμα πάχους μιας φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας. Ο αριθμός των "rouleaux" που παρατηρείται εξαρτάται από την συγκέντρωση του δείγματος στην καλυπτρίδα. Είναι εμφανές ότι όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I δίνουν δισκοειδή σωματίδια. Στα δείγματα που έχουν μικρότερη συγκέντρωση και πιο συγκεκριμένα στα σωματίδια που περιέχουν τις καρβοξυτελικές μεταλλάξεις εμφανίζονται συσσωρεύματα μονοστοιβάδων που επικάθονται οριζόντια στην επιφάνεια της καλυπτρίδας.

Το μέγεθος και η ετερογένεια των σωματιδίων rHDL μελετήθηκε και με ηλεκτροφόρηση υπό μη-αποδιατακτικές συνθήκες, σε πήκτωμα διαβάθμισης πολυακρυλαμιδίου (8-25%) (εικόνα 33).

Παρατηρούνται τρείς βασικοί πληθυσμοί σωματιδίων, με διαμέτρους 120-122 Å, 96-104 Å και 78-80 Å. Συγκεκριμένα τα σωματίδια που περιέχουν την αποA-I από το πλάσμα, τον φυσικό τύπο αποA-I, και τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: Δ(165→175), αποA-I: Δ(187→197), και αποA-I: (G185,G186→P185,P186) εμφανίζουν ένα κύριο πληθυσμό (διαμέτρου 96-104 Å) και ένα μικρότερο ποσό σωματιδίων με διάμετρο 120-122 Å. Κυρίως η αποA-I του πλάσματος σχηματίζει σωματίδια των 120-122 Å σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία (περίπου 3: 1), συγκριτικά με τις άλλες μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: Δ(165→175) και αποA-I: Δ(187→197), παρόλο που αλληλεπιδρούν πολύ αργά με πολυμεμβρανικά

λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC (εικόνα 29, πλαίσια ΣΤ και Η) δίνουν τους ίδιους πληθυσμούς σωματιδίων με αυτούς της αποΑ-Ι του πλάσματος.

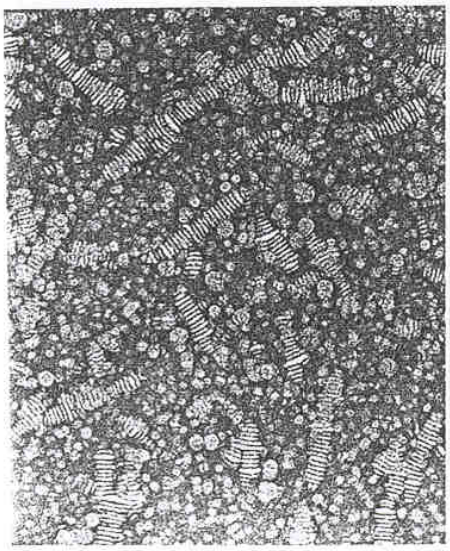
Οι καρβοξυτελικές μεταλλαγμένες μορφές της αποΑ-Ι, οι οποίες επίσης αλληλεπιδρούν εξαιρετικά αργά με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων (Εικόνα 29, πλαίσια Α-Ε), δίνουν επίσης δισκοειδή σωματίδια, που έχουν δύο κύριους πληθυσμούς: 120-122 Å και ένα μικρότερο πληθυσμό 78-80 Å, όπως φαίνεται στην εικόνα 33. Πιο αναλυτικά τα μικρότερου μεγέθους σωματίδια της αποΑ-Ι: Δ(185→243) έχουν διάμετρο περίπου 78 Å, τα σωματίδια της αποΑ-Ι: Δ(198→243) έχουν διάμετρο 79 Å, και τα σωματίδια της αποΑ-Ι: Δ(220→243) και της αποΑ-Ι: Δ(232→243) έχουν περίπου διάμετρο 80 Å. Οι διαφορές αυτές στα μεγέθη των σωματιδίων rHDL είναι προφανώς αποτέλεσμα των καρβοξυτελικών απαλοιφών.

Για τα πειράματα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT χρησιμοποιήθηκε ο μεικτός πληθυσμός των σωματιδίων.

ΕΙΚΟΝΑ 32 (A-I). Ηλεκτρονική μικρογραφία των σωματιδίων rHDL, που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την αντίδραση ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT. Πλαίσιο Α: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος , Πλαίσιο Β: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν τον φυσικό τύπο αποA-I, Πλαίσιο Γ: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(165→175), Πλαίσιο Δ: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(187→197), Πλαίσιο Ε: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(185→243), Πλαίσιο ΣΤ: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(198→243), Πλαίσιο Η: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(220→243), Πλαίσιο Θ: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(232→243) και Πλαίσιο Ι: Δισκοειδή σωματίδια που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: (G185,G186→P185, P186).

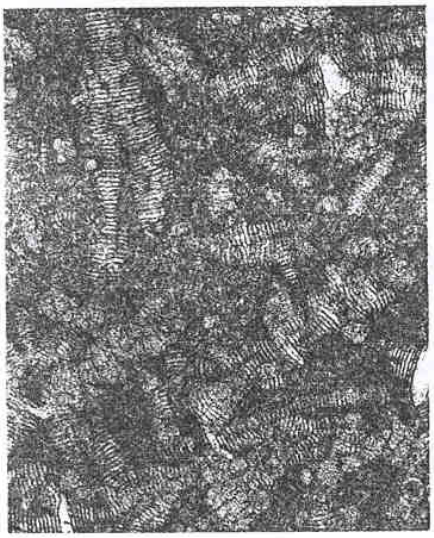
Ο φυσικός τύπος και οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I παρήχθησαν από κυτταρικές σειρές C127 που εκφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες όπως εξηγείται στις πειραματικές μεθόδους.

Α. ΑποΑ-Ι πλάσματος

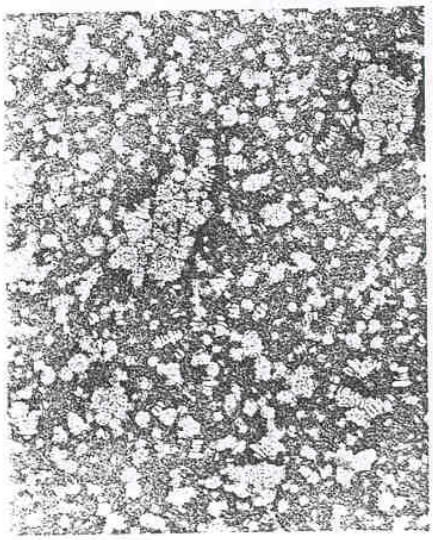


Β. Φυσικός τύπος αποΑ-Ι

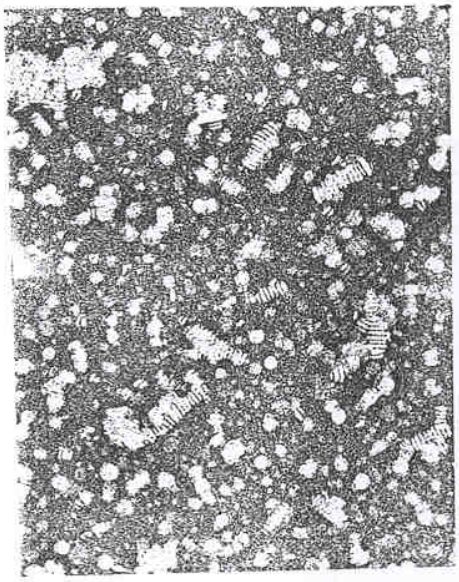
Γ. ΑποΑ-Ι: Δ(165→175)



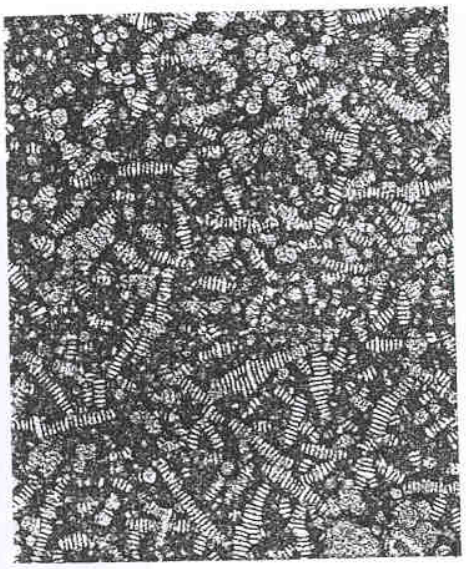
Δ. ΑποΑ-Ι: Δ(187→197)



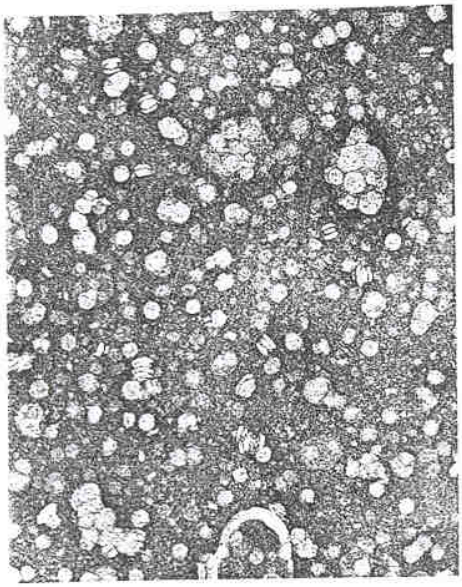
Ε. ΑποΑ-Ι: Δ(185→243)



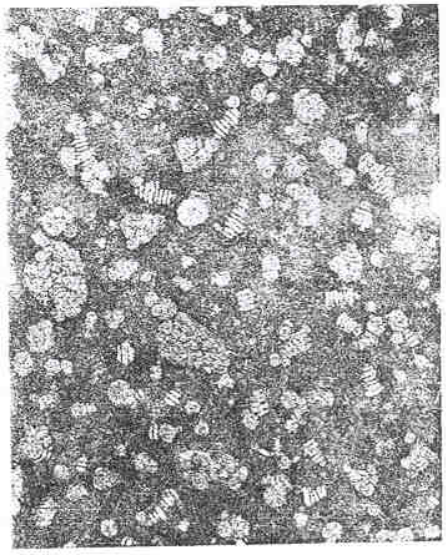
ΣΤ. ΑποΑ-Ι: Δ(198→243)



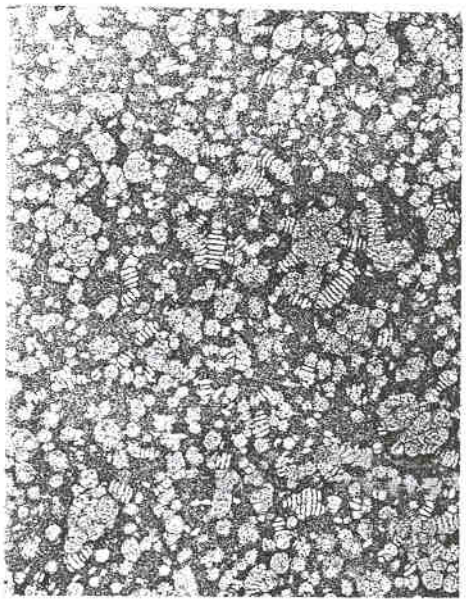
Η. ΑποΑ-Ι: Δ(220→243)



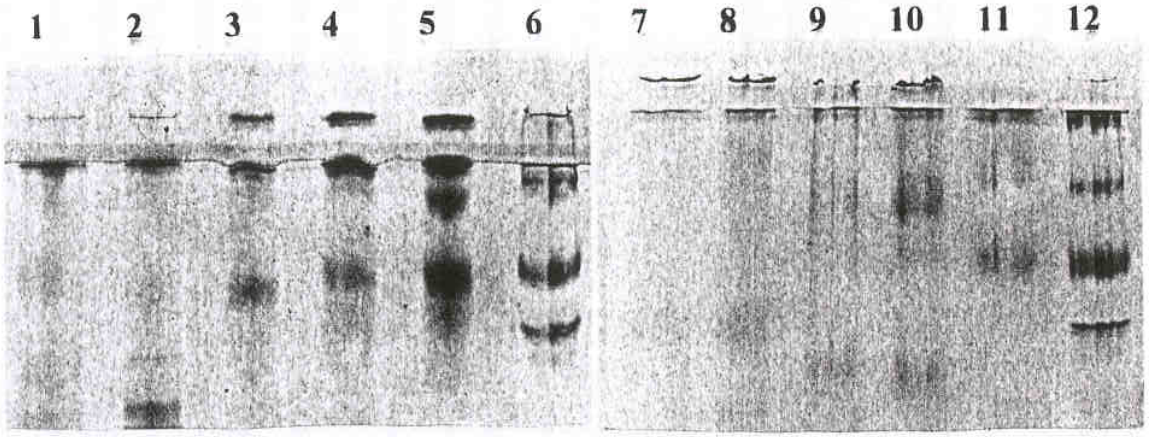
Θ. ΑποΑ-Ι: Δ(232→243)



I. Μορφή αποA-I: Gly^{185}→Pro, Gly^{186}→Pro



ΕΙΚΟΝΑ 33. Χαρακτηρισμός των σωματιδίων rHDL με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με διαβάθμιση 8-25%, υπό μη-αποδιατακτικές συνθήκες. Σειρά 1: Σωματίδια rHDL που περιέχουν τον φυσικό τύπο αποA-I, Σειρά 2: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(165→175)**,** Σειρά 3: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(187→197), Σειρά 4: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: (G185,G186→P185,P186), Σειρές 5 και 11: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος, Σειρές 6 και 12: Δείκτης μοριακών μαζών (φεριτίνη 122 Å, καταλάση 102 Å, γαλακτική αφυδρογονάση 81 Å), Σειρά 7: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(232→243), Σειρά 8: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(220→243), Σειρά 9: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(198→243), Σειρά 10: Σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(185→243).



1: rHDL{φυσικός τύπος αποA-I}
2: rHDL{αποA-I: Δ (165-175)}
3: rHDL{αποA-I: Δ (187-197)}
4: rHDL{αποA-I: G165-P, G186-P}
5: rHDL{πλάσμα αποA-I}
6: Δείκτης μοριακών μαζών: (φεριτίνη 122 Å, καταλάση 102 Å, γαλακτική αφυδρογονάση 81 Å)
7: rHDL{αποA-I: Δ (232-243)}
8: rHDL{αποA-I: Δ (220-243)}
9: rHDL{αποA-I: Δ (198-243)}
10: rHDL{αποA-I: Δ (185-243)}
11: rHDL{πλάσμα αποA-I}
12: Δείκτης μοριακών μαζών: (φεριτίνη 122 Å, καταλάση 102 Å, γαλακτική αφυδρογονάση 81 Å)

10. Ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από τις μεταλλαγμένες μορφές της από A-I

Έχει δειχθεί ότι συγκεκριμένες απολιποπρωτεΐνες, όπως αποC-I, αποA-IV, και αποE, μπορούν να ενεργοποιήσουν το ένζυμο LCAT *in vitro,* όταν χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα υπό την μορφή σωματιδίων rHDL. Σωματίδια rHDL που περιέχουν την πρωτεΐνη αποA-I αποτελούν το πιο αποτελεσματικό υπόστρωμα. Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I χρησιμοποιήθηκαν για να ταυτοποιηθούν οι περιοχές ή τα υπολλείμματα της αποA-I που συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Για το σκοπό αυτό οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή σωματιδίων rHDL που περιέχουν επίσης POPC (παλμιτοϋλο-ολεοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη) και χοληστερόλη (ραδιοσημασμένη με ^{14}C) σε αναλογία 100: 10: 1 (POPC: χοληστερόλη: αποA-I), χρησιμοποιώντας την μέθοδο διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου, που περιγράφεται στις μεθόδους (τμήμα 14). Στην μέθοδο αυτή τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη διαλυτοποιούνται κατ'αρχήν σε χολικό νάτριο και μετά από την προσθήκη της αποA-I το χολικό νάτριο απομακρύνεται σταδιακά από τα σωματίδια φωσφολιπιδίου-χοληστερόλης με διαπίδυση, που οδηγεί στην αντικατάσταση του χολικού νατρίου από την αποA-I. Τα σωματίδια rHDL έχει δειχθεί προηγουμένως ότι αποτελούν εξαιρετικά υποστρώματα για το ένζυμο LCAT (167). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται γιατί μας επιτρέπει να παρασκευάσουμε σωματίδια rHDL, ακόμη και με τις μεταλλαγμένες εκείνες μορφές που αλληλεπιδρούν πολύ αργά με φωσφολιπίδια, όπως αποA-I: Δ(185→243), αποA-I: Δ(198→243), αποA-I: Δ(220→243), αποA-I: Δ(232→243) και αποA-I: Δ(165→175).

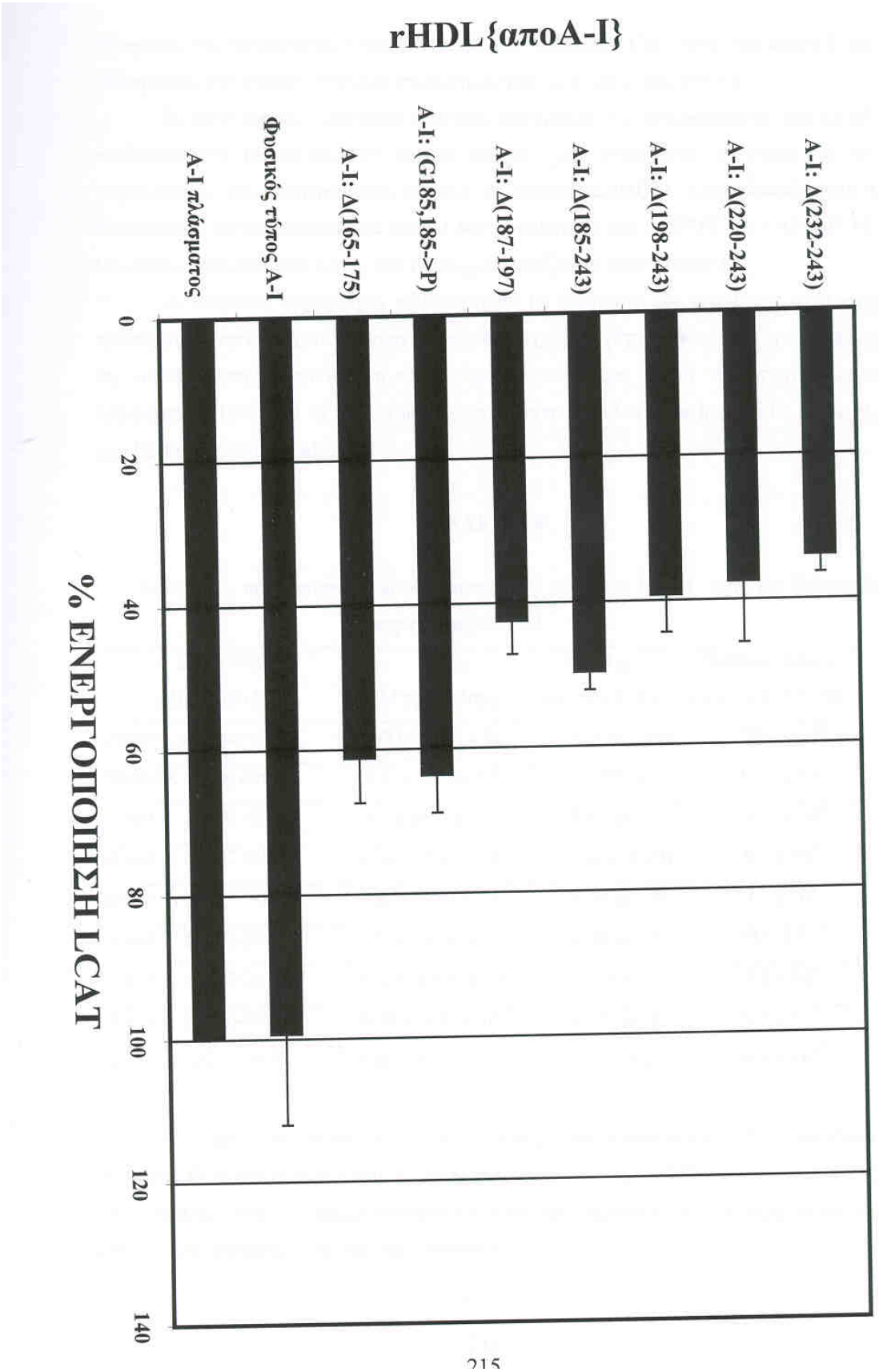
Η ενεργότητα του ενζύμου LCAT μετρήθηκε ως ποσοστό παραγωγής σημασμένων εστέρων χοληστερόλης από τα σωματίδια rHDL, όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στις μεθόδους (τμήμα 16). Οι σημασμένοι με ^{14}C-εστέρες χοληστερόλης διαχωρίστηκαν από την ελεύθερη χοληστερόλη μετά από τον τερματισμό της ενζυματικής αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η μέτρηση της ταχύτητας της ενζυματικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης της αποA-I στο rHDL παρουσία σταθερής ποσότητας ενζύμου LCAT, επιτρέπει τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης (φαινομενικό Km και Vmax- Km_{app} και $Vmax_{app}$) για τις διάφορες μορφές της αποA-I.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 34 ο φυσικός τύπος αποA-I που εκκρίνεται από κύτταρα C127 ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT με ίδια αποτελεσματικότητα με την αποA-I του πλάσματος. Η μεταλλαγμένη μορφή της αποA-I όπου οι γλυκίνες στις θέσεις 185 και

186 της έλικας 7 έχουν αντικατασταθεί από προλίνες εμφανίζει μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT σε σχέση με τον φυσικό τύπο (ποσοστό ενεργοποίησης 63%). Παρόμοιο αποτέλεσμα μειωμένης ενεργοποίησης σε σχέση με τον φυσικό τύπο της αποA-I παρατηρείται με την μεταλλαγμένη μορφή στην οποία έχουν απαλοιφεί τα πρώτα 10 αμινοξέα της έλικας, αποA-I: Δ(165→175) (ποσοστό ενεργοποίησης 61%). Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν την σημασία της έλικας 7 της αποA-I για την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Η μεταλλαγμένη μορφή της αποA-I στην οποία έχουν απαλοιφεί 10 αμινοξέα από την έλικα 8, (αποA-I: Δ(187→197)), οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT σε σχέση με τον φυσικό τύπο (ποσοστό ενεργοποίησης 43%). Είναι πιθανόν οι προαναφερθείσες απαλοιφές και οι αμινοξικές αντικαταστάσεις που εισήχθησαν στο μόριο της αποA-I να προκαλούν αλλαγή στην τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης και αλλαγή της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με το ένζυμο, με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη μειωμένη ενεργοποίηση της LCAT.

Τέλος τα σωματίδια rHDL που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: Δ(185→243), αποA-I: Δ(198→243), αποA-I: Δ(220→243) και αποA-I: Δ(232→243) έχουν μειωμένες ικανότητες ενεργοποίησης του LCAT (ποσοστά ενεργοποίησης 49, 39, 37, και 34% αντίστοιχα) σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I συνεισφέρει στην αποτελεσματική ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT.

ΕΙΚΟΝΑ 34. Ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από τον φυσικό τύπο και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Η ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT εκφράζεται ως ποσοστό παραγωγής σημασμένων εστέρων χοληστερόλης από τα σωματίδια rHDL, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Οι σημασμένοι με ^{14}C εστέρες χοληστερόλης διαχωρίσθηκαν από την ελεύθερη χοληστερόλη με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Σε όλες τις σειρές πειραμάτων με χρήση του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αποA-I (υπό την μορφή των σωματιδίων rHDL) και σταθερή ποσότητα ενζύμου LCAT. Το μέγεθος της τυπικής απόκλισης (standard deviation) βασίζεται σε 3 ή 4 πειράματα.


rHDL{αποA-I}
% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ LCAT
0
20
40
60
80
100
120
140
A-I πλάσματος
Φυσικός τύπος A-I
A-I: Δ(165-175)
A-I: (G185,185->P)
A-I: Δ(187-197)
A-I: Δ(185-243)
A-I: Δ(198-243)
A-I: Δ(220-243)
A-I: Δ(232-243)

Κινητική της αντίδρασης ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από την αποA-I του πλάσματος, τον φυσικό τύπο και τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I

Οι φαινομενικές (apparent) κινητικές παράμετροι της ενεργοποίησης του LCAT υπολογίσθηκαν μετρώντας την αρχική ταχύτητα της αντίδρασης σε σχέση με την συγκέντρωση του υποστρώματος (αποA-I σε σωματίδια rHDL). Χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις της αποA-I που κυμαίνονται από $2.29*10^{-6}$ σε $1.43*10^{-7}$ M. Οι κινητικές παράμετροι Km_{app} και $Vmax_{app}$ συνοψίζονται στον πίνακα 8.

Οι κινητικές παράμετροι καθορίστηκαν με εφαρμογή μη γραμμικής ανάλυσης προσαρμογής των ελαχίστων τετραγώνων της αρχικής ταχύτητας και της συγκέντρωσης της αποA-I, στην αναμενόμενη υπερβολική καμπύλη, με χρήση του προγράμματος Kaleidagraph (373) (fit of data, velocity versus concentration, to a hyperbolic curve by non linear regression analysis).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Κινητικές παράμετροι ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από τις διάφορες μορφές της αποA-I

Σωματίδιο rHDL{αποA-I}	Km_{app} (M πρωτεΐνης)	$Vmax_{app}$ (nmol CE /h)	$Vmax_{app}/Km_{app}$ (nmol CE /h * M)
ΑποA-I πλάσματος	5.62 (±0.38) x 10^{-7}	10.9 (±1.18)	19.4 x 10^6
Φυσικός τύπος αποA-I	7.72 (±0.5)x 10^{-7}	11.87 (±1)	15.3 x 10^6
ΑποA-I: Δ(165-175)	6.56 (±1) x 10^{-7}	9.43 (±1.2)	14.3 x 10^6
ΑποA-I: Δ(187-197)	7.96 (±1.6) x 10^{-7}	6.62 (±0.99)	8.3 x 10^6
ΑποA-I: ($G^{185,186}$-$P^{185,186}$)	6.85 (±1.9) x 10^{-7}	8.25 (±1.5)	12 x 10^6
ΑποA-I: Δ(185-243)	3 (±0.8) x 10^{-7}	4.09 (±0.5)	13.6 x 10^6
ΑποA-I: Δ(198-243)	4.22 (±0.46) x 10^{-7}	4.17 (±0.15)	9.8 x 10^6
ΑποA-I: Δ(220-243)	9.78 (±0.8) x 10^{-7}	6.37 (±0.8)	6.5 x 10^6
ΑποA-I: Δ(232-243)	8.64 (±0.33) x 10^{-7}	5.55 (±0.14)	6.4 x 10^6

Οι τιμές του φαινομενικού Km (Km_{app}) αντιπροσωπεύουν την συγγένεια σύνδεσης (binding affinity) του ενζύμου για το υπόστρωμα (rHDL) και οι τιμές της φαινομενικής Vmax ($Vmax_{app}$) αντιπροσωπεύουν την ενεργοποίηση του ενζύμου και τις καταλυτικές σταθερές (catalytic rate constants).

Οι διαφορές στην φαινομενική καταλυτική ικανότητα (apparent catalytic efficiency), που ορίζεται ως το πηλίκο των $Vmax_{app}/Km_{app}$, των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I κυμαίνονται από 40 σε 90% σε σχέση με το κοντρόλ (φυσικός τύπος αποA-I) και είναι το αποτέλεσμα διακύμανσης στις τιμές και της Km_{app} και της $Vmax_{app}$ των διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, όπως φαίνεται στον πίνακα 8.

11. Κινητική της έκκρισης του φυσικού τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I

Τα πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος (pulse chase) έγιναν για να καθοριστεί η κινητική της απώλειας της ενδοκυττάριας μορφής της αποA-I και της έκκρισή της στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Η ανάλυση αυτή ήταν αναγκαία διότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αποA-I: Δ(165→243) και αποA-I: Δ(175→243) δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν από το μέσο καλλιέργειας των σταθερών κυτταρικών σειρών C127 που τις εκφράζουν. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην μειωμένη έκκρισή τους στο μέσο καλλιέργειας, λόγω της πιθανής ενδοκυτταρικής αποικοδόμησής τους ή την εξωκυττάρια πρωτεολυτική τους διάσπαση. Τα πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος έγιναν χρησιμοποιώντας τις μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: Δ(165→243), αποA-I: Δ(175→243) και τον φυσικό τύπο της αποA-I. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: οι κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές και τον φυσικό τύπο ιχνοθετήθηκαν με ^{35}S μεθειονίνη για μία ώρα (pulse). Το ραδιενεργό υλικό που περιείχε ^{35}S μεθειονίνη αντικατεστάθη (μετά από μία ώρα ραδιοσήμανσης) με μη ραδιενεργό υλικό που περιείχε 10 mM μη-ραδιοσημασμένης μεθειονίνης. Σε διάφορα χρονικά διαστήματα (chase) συνελέγη το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα υπέστησαν λύση, όπως εξηγείται στις μεθόδους (τμήμα 17). Το κυτταρικό λύμα και το μέσο καλλιέργειας υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA-I αντισώματα και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS και αυτοραδιογραφία, όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Ακολούθησε έκθεση του ξηρανθέντος πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου σε phosphor-imager και εκτίμηση του ποσού της ραδιένεργειας της κάθε ζώνης αποA-I με το πρόγραμμα Image Quant.

Η κινητική της ελάττωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ^{35}S-αποA-I και της αύξησης της στο μέσο καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου δίνεται στην Εικόνα 35 Α. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 35 Α η μεγίστη ποσότητα της εκκριθείσας ^{35}S-αποA-I του φυσικού τύπου παρατηρείται σε περίπου 50 λεπτά. Στα πρώτα 30 λεπτά η αύξηση της

εκκρινόμενης και η ελλάττωση της ενδοκυττάριας μορφής της ^{35}S-αποA-I ακολουθεί περίπου ευθεία γραμμή. Επίσης το ποσό της αύξησης της εκκρινόμενης αποA-I αντιστοιχεί περίπου στο ποσό της απώλειας της ενδοκυτάριας αποA-I, π. χ. στα 20 λεπτά η εκκριθείσα και η ενδοκυττάρια αποA-I είναι 3100000 και 1500000 cpm αντίστοιχα, σε 30 λεπτά είναι 2100000 και 2200000 cpm αντίστοιχα και σε 50 λεπτά είναι 1500000 και 2800000 cpm αντίστοιχα. Το άθροισμα του ποσού ραδιένεργειας (cpm) σε 20, 30 και 50 λεπτά είναι 460.0000, 4300000 και 4300000 cpm αντίστοιχα. Η προέκταση της καμπύλης που αντιστοιχεί στην απώλεια της ενδοκυττάριας μορφής της αποA-I δίνει περίπου 4900000 cpm. Αυτό φανερώνει ότι στα πρώτα 50 λεπτά μετά από την απομάκρυνση της ραδιοσημασμένης μεθειονίνης η απώλεια της εκκριθείσας και της ενδοκυττάριας μορφής της ^{35}S-αποA-I είναι σχετικά μικρή και η διαδικασία έκκρισης και απώλειας της ενδοκυττάριας μορφής της αποA-I μπορούν να περιγραφούν περίπου με κινητική πρώτης τάξης. Η εξίσωση που περιγράφει το φαινόμενο είναι η εξής:

$$2.3 \log ([So] / [S]) = k \times t ,$$

όπου: So αντιστοιχεί στην συγκέντρωση (cpm) της αποA-I σε χρόνο μηδέν (to), S αντιστοιχεί στην συγκέντρωση (cpm) της αποA-I σε χρόνο t, και k είναι η σταθερά πρώτης τάξεως (min^{-1}).

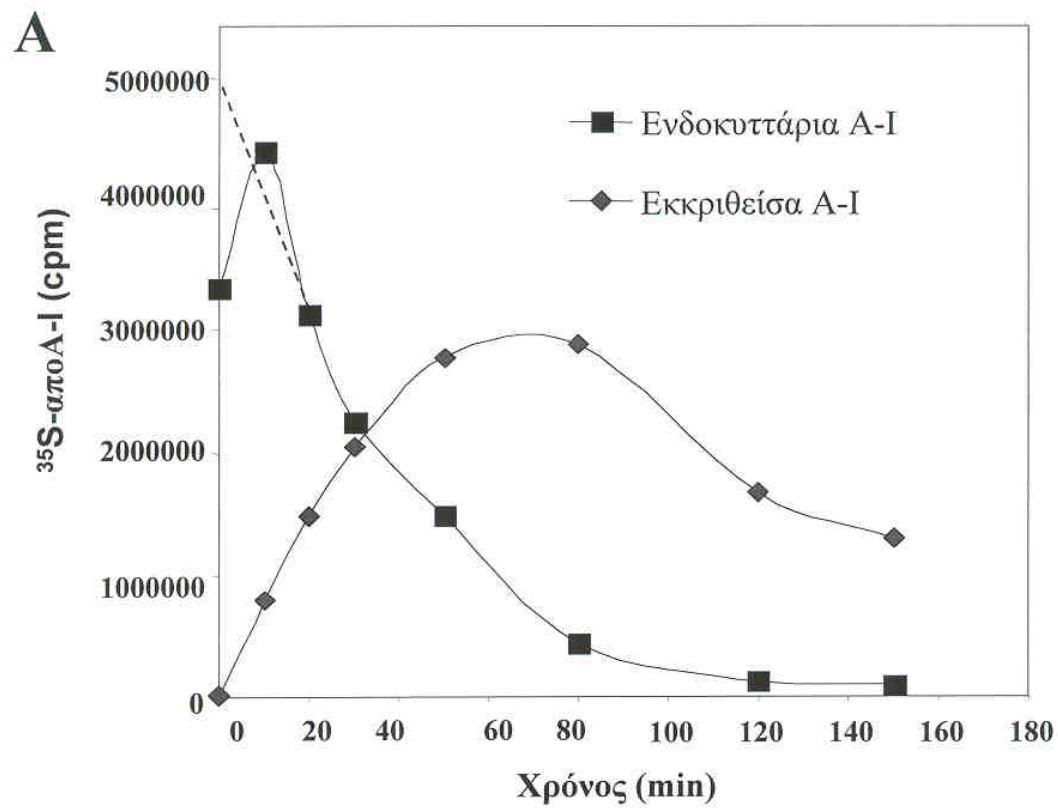
Η ανάλυση της ελλάττωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της αποA-I σε χρονικό διάστηματα μέχρι 80 λεπτά φαίνεται να ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, που μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τον χρόνο ημίσσειας ζωής (t ½) από την γραφική παράσταση log ^{35}S-αποA-I συναρτήσει του χρόνου.Η γραφική παράσταση απώλειας της ενδοκυττάριας μορφής της αποA-I σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα log ^{35}S-αποA-I συναρτήσει του χρόνου δίνεται στην εικόνα 35 Β. Η ανάλυση αυτή επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες (368) και φανερώνει ότι ο χρόνος ημίσσειας ζωής ($t_{1/2}$) της ενδοκυττάριας μορφής της αποA-I, μετά από πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος, είναι περίπου 19.5 λεπτά. Η αντίστοιχη σταθερά πρώτης τάξεως είναι 3.55×10^{-2} min^{-1}.

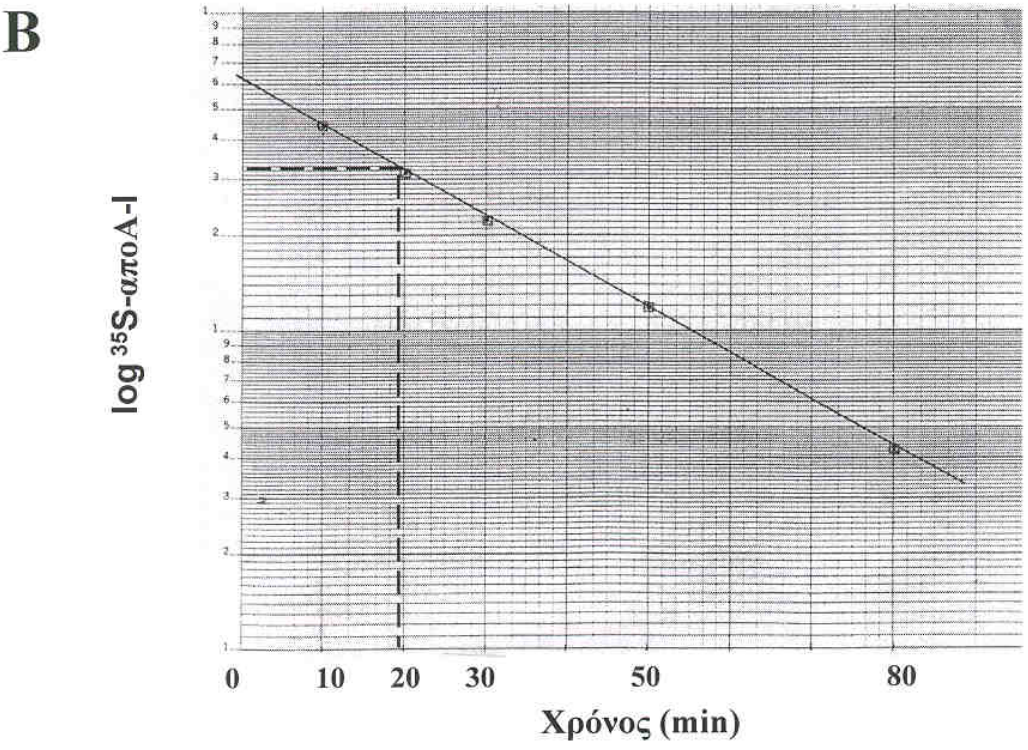
Παρόμοια κινητική ανάλυση έγινε και για τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, αποA-I: Δ(165→243) και αποA-I: Δ(175→243). Η κινητική της έκκρισης των ραδιοσημασμένων μορφών αποA-I: Δ(165→243) και αποA-I: Δ(175→243) και η ελλάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής τους παρουσιάζεται στις εικόνες 36 (πλαίσιο Α) και 37 (πλαίσιο Α) αντίστοιχα. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι στα πρώτα 50 λεπτά μετά από την απομάκρυνση της ραδιοσημασμένης μεθειονίνης η απώλεια της εκκριθείσας και της ενδοκυττάριας μεταλλαγμένης μορφής της ^{35}S-αποA-I είναι σχετικά

μικρή. Η γραφική παράσταση απώλειας των ενδοκυττάριων μορφών αποA-I: Δ(165→243) και αποA-I: Δ(175→243) σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα συναρτήσει του χρόνου δίνεται στις εικόνες 36 (πλαίσιο Β) και 37 (πλασίσιο Β) αντίστοιχα. Η ανάλυση φανερώνει ότι ο χρόνος ημίσσειας ζωής ($t_{1/2}$) της ενδοκυττάριας αποA-I είναι περίπου 40 λεπτά για την αποA-I: Δ(165→243) (εικόνα 36Β) και 45 λεπτά για την αποA-I: Δ(175→243) (εικόνα 37Β). Οι σταθερές πρώτης τάξεως για την αποA-I: Δ(165→243) και είναι αποA-I: Δ(175→243) είναι 1.7×10^{-2} (min^{-1}) και 1.5×10^{-2} (min^{-1}) αντίστοιχα.

Ο χρόνος ημίσσειας ζωής για τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I είναι περίπου διπλάσιος αυτού της αποA-I του φυσικού τύπου. Η παρατηρούμενη επιβράδυνση στην κινητική έκκρισης των αποA-I: Δ(165→243) και αποA-I: Δ(175→243) υποδηλώνει ότι οι απαλοιφές των καρβοξυτερματικών αμινοξέων 165-243 ή 175-243 πιθανόν να αποσταθεροποιούν την αποA-I μέσα στο κύτταρα και να επιβραδύνουν την έκκρισή της. Πιο συστηματικές μελέτες απαιτούνται για να καθοριστεί αν η αποA-I που εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας έχει υποστεί ενδοκυττάρια αποικοδόμηση.

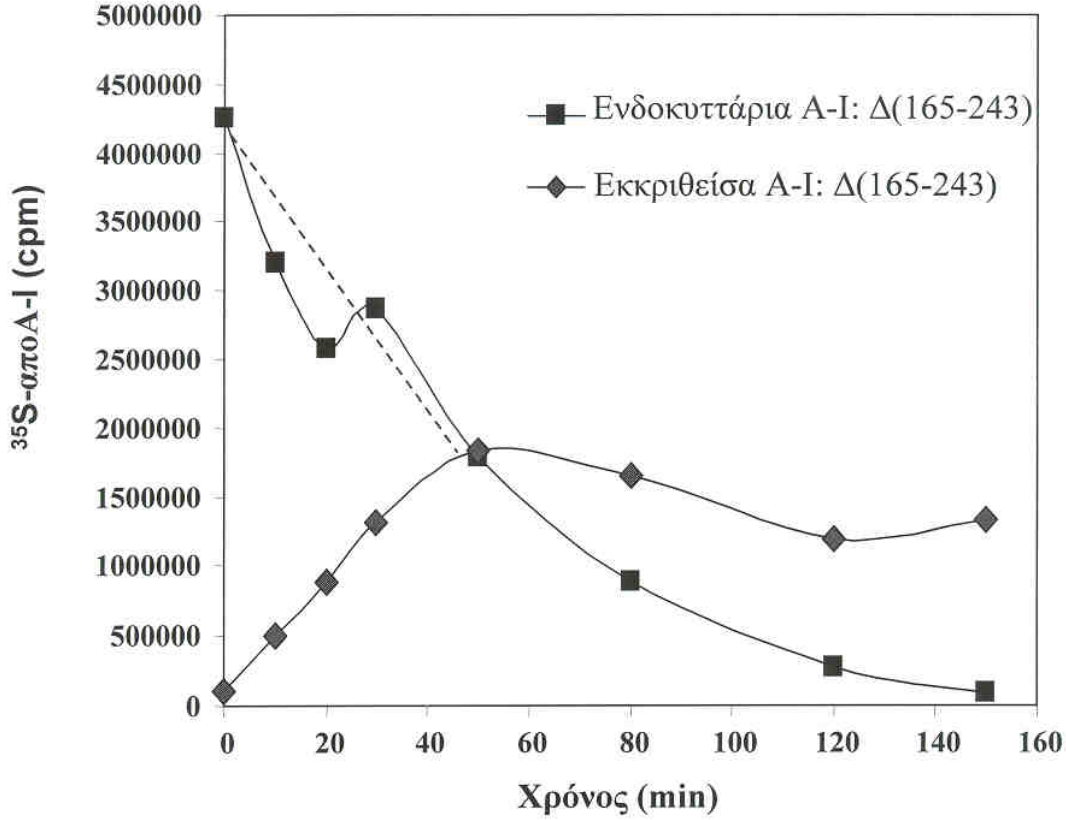
Εικόνα 35 (Α, Β). Κινητική της μεταβολής της ενδοκυττάριας και εκκριθείσας αποΑ-Ι φυσικού τύπου από κυτταρικές γραμμές C127 συναρτήσει του χρόνου. Πλαίσιο Α. Ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ^{35}S-αποΑ-Ι και αύξηση της εκκριθείσας αποΑ-Ι για την αποΑ-Ι φυσικού τύπου, συναρτήσει του χρόνου. Μονοστοιβάδες κυττάρων C127 που εκφράζουν το γονίδιο του φυσικού τύπου της αποΑ-Ι σημάνθηκαν με ^{35}S μεθειονίνη. Το μέσο καλλιέργειας και τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν, ανοσοκατακρημνίσθηκαν με αντίσωμα για την αποΑ-Ι και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS και αυτοραδιογραφία. Η εκτίμηση του ποσού ραδιενέργειας της κάθε ζώνης έγινε με την χρήση του προγράμματος Image Quant. **Πλαίσιο Β.** Γραφική παράσταση log^{35}S-αποΑ-Ι συναρτήσει του χρόνου για την αποΑ-Ι φυσικού τύπου. Η γραφική παράσταση επιτρέπει τον υπολογισμό του χρόνου ημισσείας ζωής της ενδοκυττάριας σημασμένης (με ^{35}S) αποΑ-Ι του φυσικού τύπου, που είναι περίπου 19.5 λεπτά.


A
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
^{35}S-αποA-I (cpm)
Ενδοκυττάρια A-I
Εκκριθείσα A-I
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Χρόνος (min)

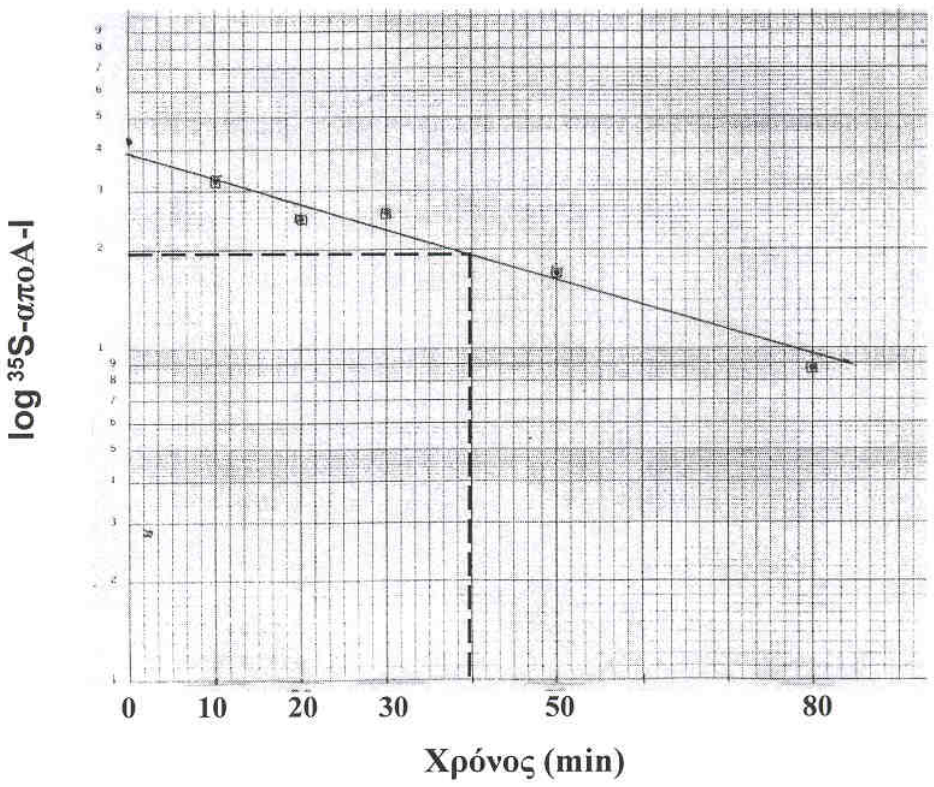

B
log ^{35}S-αποA-I
0
10
20
30
50
80
Χρόνος (min)

Εικόνα 36 (Α, Β). Κινητική της μεταβολής της ενδοκυττάριας και εκκριθείσας αποΑ-Ι: Δ(165→243) από κυτταρικές γραμμές C127 συναρτήσει του χρόνου.
Πλαίσιο Α. Ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ^{35}S-αποΑ-Ι και αύξηση της εκκριθείσας αποΑ-Ι για την αποΑ-Ι: Δ(165→243), συναρτήσει του χρόνου. Μονοστοιβάδες κυττάρων C127 που εκφράζουν το γονίδιο του φυσικού τύπου της αποΑ-Ι σημάνθηκαν με ^{35}S μεθειονίνη. Το μέσο καλλιέργειας και τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν, ανοσοκατακρημνίσθηκαν με αντίσωμα για την αποΑ-Ι και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS και αυτοραδιογραφία. Η εκτίμηση του ποσού ραδιενέργειας της κάθε ζώνης έγινε με την χρήση του προγράμματος Image Quant. Πλαίσιο Β. Γραφική παράσταση log^{35}S-αποΑ-Ι συναρτήσει του χρόνου για την αποΑ-Ι: Δ(165→243). Η γραφική παράσταση επιτρέπει τον υπολογισμό του χρόνου ημισσείας ζωής της ενδοκυττάριας σημασμένης (με ^{35}S) αποΑ-Ι: Δ(165→243), που είναι περίπου 40 λεπτά.

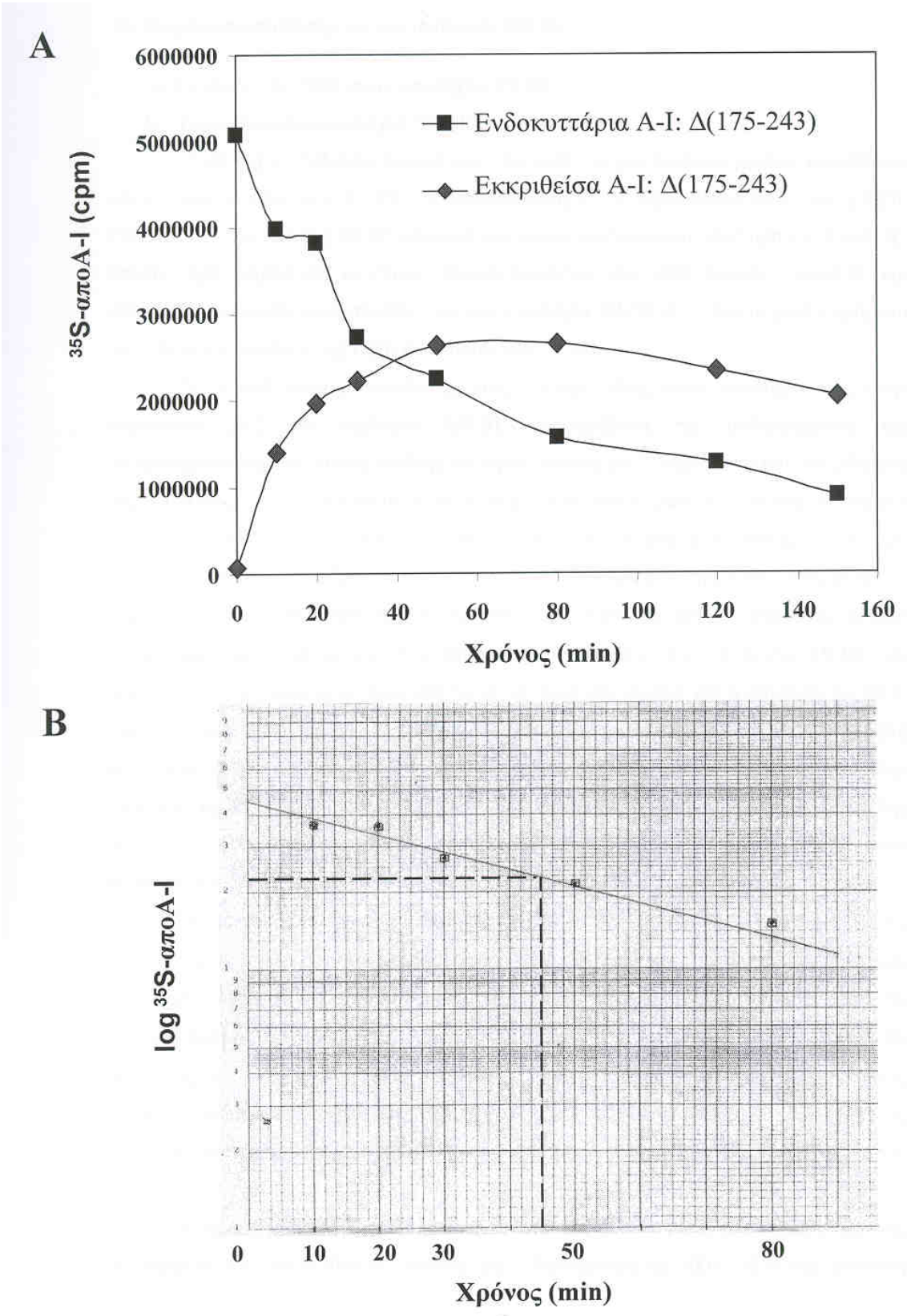
A


5000000
4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
35S-αποA-I (cpm)
Ενδοκυττάρια A-I: Δ(165-243)
Εκκριθείσα A-I: Δ(165-243)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Χρόνος (min)

B


log 35S-αποA-I
0
10
20
30
50
80
Χρόνος (min)

Εικόνα 37 (Α, Β). Κινητική της μεταβολής της ενδοκυττάριας και εκκριθείσας αποΑ-Ι: Δ(175→243) από κυτταρικές γραμμές C127 συναρτήσει του χρόνου. Πλαίσιο Α. Ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ^{35}S-αποΑ-Ι και αύξηση της εκκριθείσας αποΑ-Ι για την αποΑ-Ι: Δ(175→243), συναρτήσει του χρόνου. Μονοστοιβάδες κυττάρων C127 που εκφράζουν το γονίδιο του φυσικού τύπου της αποΑ-Ι σημάνθηκαν με ^{35}S μεθειονίνη. Το μέσο καλλιέργειας και τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν, ανοσοκατακρημνίσθηκαν με αντίσωμα για την αποΑ-Ι και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS και αυτοραδιογραφία. Η εκτίμηση του ποσού ραδιενέργειας της κάθε ζώνης έγινε με την χρήση του προγράμματος Image Quant. **Πλαίσιο Β.** Γραφική παράσταση log^{35}S-αποΑ-Ι συναρτήσει του χρόνου για την αποΑ-Ι: Δ(175→243). Η γραφική παράσταση επιτρέπει τον υπολογισμό του χρόνου ημισσείας ζωής της ενδοκυττάριας σημασμένης (με ^{35}S) αποΑ-Ι: Δ(175→243), που είναι περίπου 45 λεπτά.


A
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
^{35}S-αποA-I (cpm)
Ενδοκυττάρια A-I: Δ(175-243)
Εκκριθείσα A-I: Δ(175-243)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Χρόνος (min)
B
log ^{35}S-αποA-I
0
10
20
30
50
80
Χρόνος (min)

12. Πειράματα σύνδεσης με τον υποδοχέα SR-BI

Α) Σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI

1) Τεχνική ραδιο-υποδοχέα (Radioreceptor Assay)

Ο υποδοχέας SR-BI αποτελεί τον υποδοχέα για μια ποικιλία μορίων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η LDL, η ακετυλιωμένη και η οξειδωμένη LDL, και η HDL (121, 278). Ο υποδοχέας SR-BI αποτελεί τον πρώτο φυσιολογικό υποδοχέα για την HDL. Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι κύριες απολιποπρωτεΐνες της HDL (αποA-I, αποA-II, και αποC-III) αποτελούν τους συνδέτες για τον υποδοχέα SR-BI (21). Στα αρχικά πειράματα μελετήθηκε η σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI.

Το τυπικό πείραμα σύνδεσης μιας λιποπρωτεΐνης στον υποδοχέα της, στην περίπτωσή μας τον υποδοχέα SR-BI, περιλαμβάνει την ραδιοσήμανση της απολιποπρωτεΐνης της λιποπρωτεΐνης (συνήθως γίνεται με ^{125}I-ιωδίωση) και την μέτρηση της σύνδεσης των λιποπρωτεϊνών με κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα (τεχνική ραδιο-υποδοχέα). Στην εικόνα 38 φαίνεται μια τυπική καμπύλη σύνδεσης σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] της ^{125}I-HDL (πυκνότητας 1.1-1.13 g/ml), συναρτήσει της συγκέντρωσής της. Τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] προέρχονται από κύτταρα ldlA-7, και είναι μόνιμα μετασχηματισμένα με φορείς που εκφράζουν το γονίδιο του υποδοχέα SR-BI του ποντικού. Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας έδειξαν ότι η σύνδεση της HDL στα κύτταρα ldlA[mSR-BI] γίνεται με SR-BI-εξαρτώμενο τρόπο και η χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την καρβοξυτελική περιοχή του SR-BI, αναστέλλει την σύνδεση της HDL στα κύτταρα ldlA[mSR-BI]. Επομένως η παρατηρούμενη σύνδεση της HDL στα κύτταρα ldlA[mSR-BI], που θα περιγραφεί στην συνέχεια, οφείλεται στην έκφραση του SR-BI και την ιδιότητά του να δρα ως φυσιολογικός υποδοχέας της HDL.

Σε ένα τυπικό πείραμα σύνδεσης τα κύτταρα επωάζονται για 1.5 ώρα, σε 37° C, με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της HDL. Μετά από έκπλυση, τα κύτταρα διαλυτοποιούνται σε διάλυμα καυστικού νατρίου και όλο το δείγμα χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ποσού της ραδιενέργειας και της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Οι μετρήσεις των δειγμάτων έγιναν απουσία ή παρουσία 40-πλάσιου ποσού πρωτεϊνικής μάζας μη-ραδιοσημασμένης HDL. Οι επωάσεις της ^{125}I-HDL παρουσία της πλειονότητας της μη-σημασμένης HDL έγιναν για τον καθορισμό των τιμών της μη ειδικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL στα κύτταρα.

Οι τιμές της ολικής σύνδεσης δίνονται από την μέτρηση του ποσού ραδιενέργειας, σε δείγματα που επωάσθηκαν απουσία μη-ραδιοσημασμένης HDL. Η ειδική σύνδεση

καθορίστηκε ως η διαφορά της ολικής από την μη ειδική σύνδεση για κάθε συγκέντρωση της ^{125}I-HDL. Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης εκφράζονται σε νανογραμμάρια πρωτεΐνης (της HDL) συνδεδεμένης με τα κύτταρα ανά mg της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι τιμές της ειδικής και της μη-ειδικής σύνδεσης ελήφθησαν από μη γραμμική ανάλυση, ως εξής: Η HDL που έχει συνδεθεί με τα κύτταρα αναλύθηκε σε σχέση με την αρχική της συγκέντρωση σε κάθε πειραματικό σημείο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism. Για την περιγραφή του φαινομένου χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά μοντέλα, τα οποία περιγράφουν: 1) υψηλή συγγένεια και κορεσμός σύνδεσης σε μια μοναδική τάξη θέσεων στον υποδοχέα SR-BI, 2) υψηλή συγγένεια και κορεσμός σύνδεσης σε 2 μη-ισοδύναμες θέσεις στον υποδοχέα SR-BI και 3) υψηλή συγγένεια και κορεσμός σύνδεσης σε μια θέση και χαμηλή συγγένεια και σύνδεση που δεν οδηγεί σε κορεσμό σε άλλες θέσεις. Τα πειραματικά δεδομένα συμφωνούν με το τρίτο μοντέλο που περιγράφει υψηλή συγγένεια και κορεσμό σύνδεσης της HDL στον υποδοχέα SR-BI σε μια θέση και χαμηλή συγγένεια σύνδεσης που δεν οδηγεί σε κορεσμό σε άλλες θέσεις. Η εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο είναι η ακόλουθη

$$B_{\text{ολική}} = Bmax_{app}\,[\text{συνδέτη}]/\,(Kd_{app}+[\text{συνδέτη}])+(NS\ x[\text{συνδέτη}]),$$

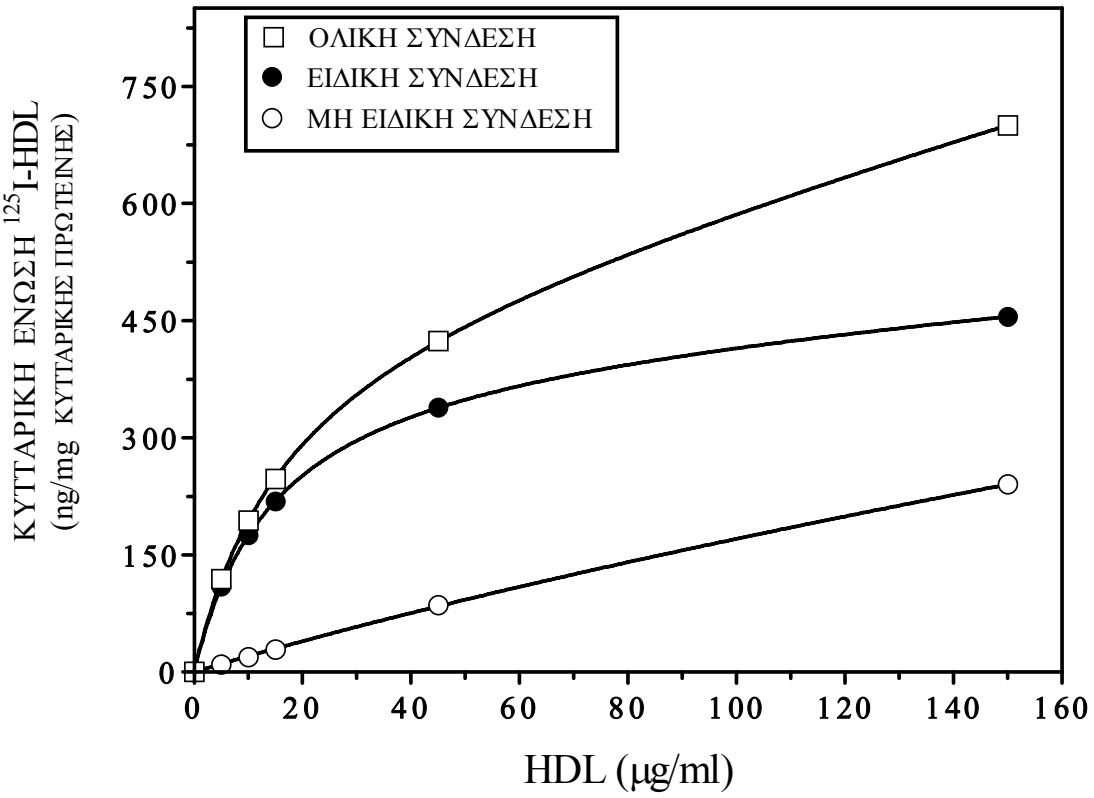
(Ολική σύνδεση = Ειδική σύνδεση + Μη ειδική σύνδεση),

όπου Β ολική είναι η πειραματικά προσδιοριζόμενη ποσότητα του συνδέτη (HDL) που έχει συνδεθεί στα κύτταρα, $Bmax_{app}$ είναι η μεγίστη φαινομενική (apparent) ποσότητα της HDL που συνδέεται όταν επέλθει κορεσμός, Kd_{app} είναι η φαινομενική (apparent) σταθερά διάστασης υψηλής συγγένειας και NS είναι η κλίση της ευθείας που αντιστοιχεί στην μη ειδική σύνδεση που δεν οδηγεί σε κορεσμό.

Οι τιμές της μη ειδικής σύνδεσης που υπολογίσθηκαν με μη γραμμική ανάλυση (πρόγραμμα Prism) είναι σε συμφωνία με τις τιμές της σύνδεσης της ^{125}I-HDL στα κύτταρα παρουσία πλειονότητας (40-πλάσιου ποσού πρωτεϊνικής μάζας) μη ραδιοσημασμένης HDL. Με βάση την παραπάνω εξίσωση υπολογίζεται ότι η HDL συνδέεται με μεγάλη συγγένεια σε μια κατηγορία υποδοχέων στα κύτταρα ldlA[mSR-BI], που αντιστοιχεί σε τιμή Kd_{app} 16.3±0.4 μg πρωτεΐνης/ml και τιμή $Bmax_{app}$ 450±8 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι τιμές της $Bmax_{app}$ ποικίλλουν από πείραμα σε πείραμα, πιθανώς λόγω της ποικιλότητας στην έκφραση του υποδοχέα SR-BI στα διαφορετικά πειράματα. Αντίθετα η τιμή Kd_{app} είναι σταθερά αναπαραγώμενη από πείραμα σε πείραμα, όταν χρησιμοποιείται προσφάτως ραδιοσημασμένη HDL. Η τιμή Kd_{app} μπορεί να αλλάζει ανάλογα με την ηλικία του παρασκευάσματος της ^{125}I-HDL,

ΕΙΚΟΝΑ 38. Σύνδεση της σφαιρικής HDL στον υποδοχέα SR-BI με βάση την τεχνική του ραδιο-υποδοχέα. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε θρεπτικό μέσο Α με πυκνότητα 4.5-5*10^4 κυττάρων ανά θέση. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα σε 37° C, με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ^{125}I-HDL (πυκνότητας 1.1-1.13 g/ml και ειδικής ενεργότητας 523 cpm/ng), η οποία σημάνθηκε 3 μέρες πριν από το πείραμα. Η κυτταρική σύνδεση της ^{125}I-HDL προσδιορίστηκε με την μέτρηση δειγμάτων εις διπλούν, όπως έχει περιγραφεί στο τμήμα 18Γ των μεθόδων. Τα ανοικτά τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τις παρατηρούμενες ολικές τιμές σύνδεσης. Οι ειδικές τιμές (●) και οι μη ειδικές τιμές σύνδεσης (❍) υπολογίσθηκαν με μη-γραμμική ανάλυση, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism, όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στα αποτελέσματα.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΡΑΔΙΟ-ΥΠΟΔΟΧΕΑ



πιθανώς ως αποτέλεσμα οξείδωσης της ραδιοσημασμένης HDL με την πάροδο του χρόνου. Για παράδειγμα το παρασκεύασμα της εικόνας 38 χρησιμοποιήθηκε τρεις μέρες μετά την ραδιοσήμανση της HDL. Το ίδιο παρασκεύασμα όταν χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα σύνδεσης 15 και 55 μέρες μετά την ιωδίωση της HDL οι τιμές Kd_{app} ήταν 10.4±2 and 4.9±1 μg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Γενικώς παρατηρήθηκε ότι η συγγένεια σύνδεσης αυξάνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία του ραδιοσημασμένου παρασκευάσματος της HDL. Η αύξηση της ηλικίας επηρεάζει την ηλεκτροφορητική της κινητικότητα (πιθανώς λόγω οξείδωσης) και τα παρασκευάσματα που εμφανίζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα δεν χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες που περιφράφονται κατωτέρω.

2) Τεχνική ανοσο-υποδοχέα (Immunoreceptor assay)

Όπως περιγράφεται στην τεχνική του ραδιο-υποδοχέα είναι εμφανές ότι μπορεί να υπάρχει ποικιλότητα στα αποτελέσματα, ανάλογα με την ηλικία της ραδιοσημασμένης λιποπρωτεΐνης. Επίσης η ραδιοσήμανση με ^{125}I είναι πιθανό να επηρεάζει τις ιδιότητες της λιποπρωτεΐνης, είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο, για παράδειγμα, ως αποτέλεσμα οξείδωσης. Οι παρατηρήσεις αυτές, σε συνδυασμό με πρακτικές δυσκολίες για την ραδιοσήμανση των πρωτεϊνών που είναι διαθέσιμες σε μικρά ποσά κατέστησαν αναγκαία την ανάπτυξη εναλλακτικής μεθόδου για την μέτρηση της σύνδεσης των πρωτεϊνών στον υποδοχέα SR-BI. Η νέα τεχνική καλείται τεχνική ανοσο-υποδοχέα (immunoreceptor assay) και το πλεονέκτημά της είναι ότι βασίζεται στην χρήση μη ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών των οποίων η σύνδεση στα κύτταρα μπορεί να μετρηθεί με ποσοτική ανοσο-αποτύπωση. Το πρώτο στάδιο για την εκτίμηση της νέας μεθόδου είναι η συγκριτική μελέτη της σύνδεσης της HDL στον υποδοχέα SR-BI με εφαρμογή και των δύο μεθόδων.

Η εικόνα 39 δείχνει την σύνδεση μη-ραδιοσημασμένης σφαιρικής HDL (πυκνότητας 1.13 g/ml) στον υποδοχέα SR-BI, με βάση την τεχνική του ανοσο-υποδοχέα, η οποία έχει περιγραφεί αναλυτικά στις μεθόδους. Συνοπτικά, κύτταρα ldlA-7 και ldlA[mSR-BI] επωάσθηκαν με τις διάφορες συγκεντρώσεις της HDL σε 37° C για 1.5 ώρα, και μετά από την έκπλυσή τους διαλυτοποιήθηκαν και συλλέχθηκαν τα κυτταρικά λύματα. Ακολούθησε

ανάλυση συγκεκριμένου ποσού των κυτταρικών λυμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (12%), παρουσία SDS. Ταυτόχρονα στο ίδιο πήκτωμα αναλύθηκαν σταθερές ποσότητες της HDL που χρησιμοποιήθηκε στο αρχικό πείραμα σύνδεσης, με σκοπό την δημιουργία της γραφικής παράστασης αναφοράς
(standard curve), που δίνει την ένταση του σήματος της HDL συναρτήσει της συγκέντρωσής της. Η καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της HDL που συνδέεται στα κύτταρα. Τα δείγματα μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες υβριδοποίησης (PVDF) και επωάσθηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα για την ανθρώπινη αποA-I (το αντίσωμα αναγνωρίζει τα αμινοξέα 118-141 της ανθρώπινης πρωτεΐνης αποA-I). Τέλος επωάσθηκαν με αντίσωμα έναντι της IgG του ποντικού συνδεδεμένης με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase). Με την προσθήκη μετά από μία ώρα του αντιδραστηρίου-υποστρώματος ενισχυμένου χημειοφθορισμού (ECL) οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματίστηκαν μαύρες και ανιχνεύθηκαν μετά από έκθεση σε φίλμ Kodak, σε μηχάνημα Kodak Digital Science Image Station 440CF. Η ποσοτικοποίηση της έντασης της κάθε ζώνης έγινε με την χρήση του προγράμματος Image Quant, ως εξής: σχεδιάστηκε ένα παραλληλεπίπεδο που περιέχει την ζώνη που μας ενδιαφέρει και υπολογίσθηκε η έντασή της. Στη συνέχεια το ίδιο παραλληλεπίπεδο μεταφέρθηκε στην ίδια σειρά, σε μια κοντινή στην ζώνη περιοχή που δεν περιέχει πρωτεΐνη, και υπολογίσθηκε η τιμή της έντασης της περιοχής αυτής, η οποία ορίζεται ως μη ειδικό σήμα (background). Η καθαρή ένταση της ζώνης υπολογίστηκε με την αφαίρεση της έντασης του μη ειδικού σήματος από την ολική ένταση του παραλληλεπιπέδου που περιέχει την ζώνη. Στο στάδιο αυτό ήταν αναγκαία η αναγωγή των τιμών της έντασης σε τιμές μάζας (ng) των πρωτεϊνών. Η μετατροπή έγινε με χρήση της γραφικής παράστασης αναφοράς που περιγράφεται ανωτέρω. Παρατηρήθηκε ότι οι γραφικές παραστάσεις αναφοράς ήταν μη γραμμικές και το καλύτερο μοντέλο για την περιγραφή ήταν η χρήση πολυνομικής εξίσωσης δεύτερης τάξης (polynomial second order regression). Με βάση τις καμπύλες αναφοράς υπολογίσθηκε η ολική σύνδεση, η οποία εκφράζεται σε ng πρωτεΐνης HDL συνδεδεμένης με τα κύτταρα, ανά mg ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι ειδικές και οι μη ειδικές τιμές σύνδεσης υπολογίσθηκαν με μη γραμμική ανάλυση, με βάση το μοντέλο

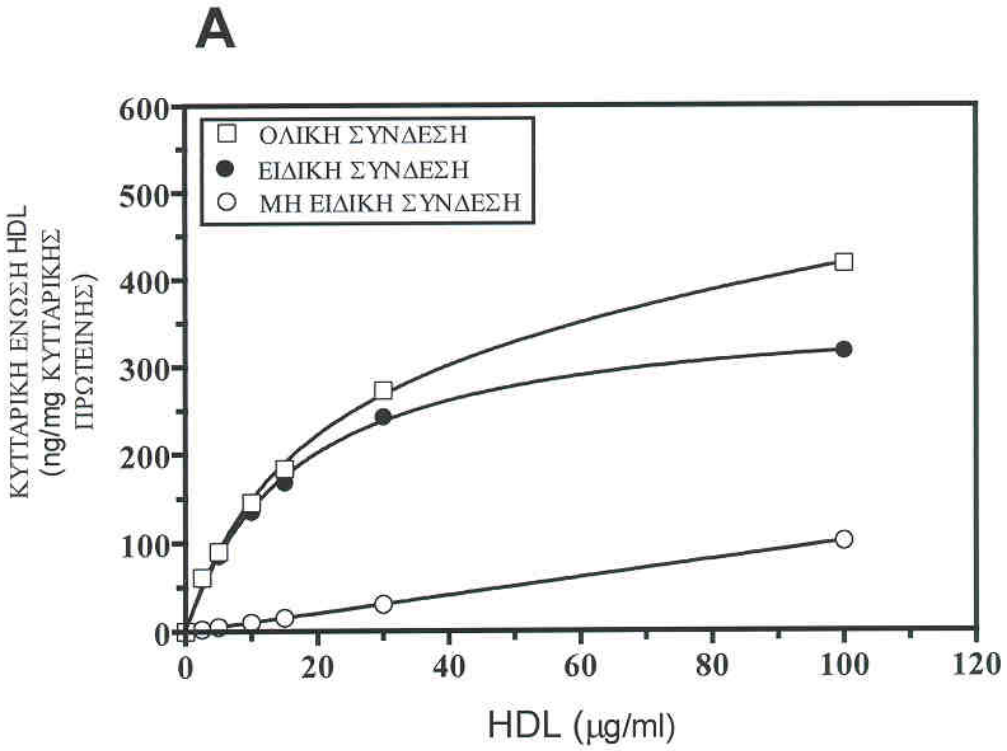
που έχει περιγραφεί για την τεχνική του ραδιο-υποδοχέα. Το μοντέλο αυτό περιγράφει σύνδεση υψηλής συγγένειας που οδηγεί σε κορεσμό σε μια κατηγορία θέσεων και μη ειδική σύνδεση που δεν οδηγεί σε κορεσμό σε άλλες θέσεις.

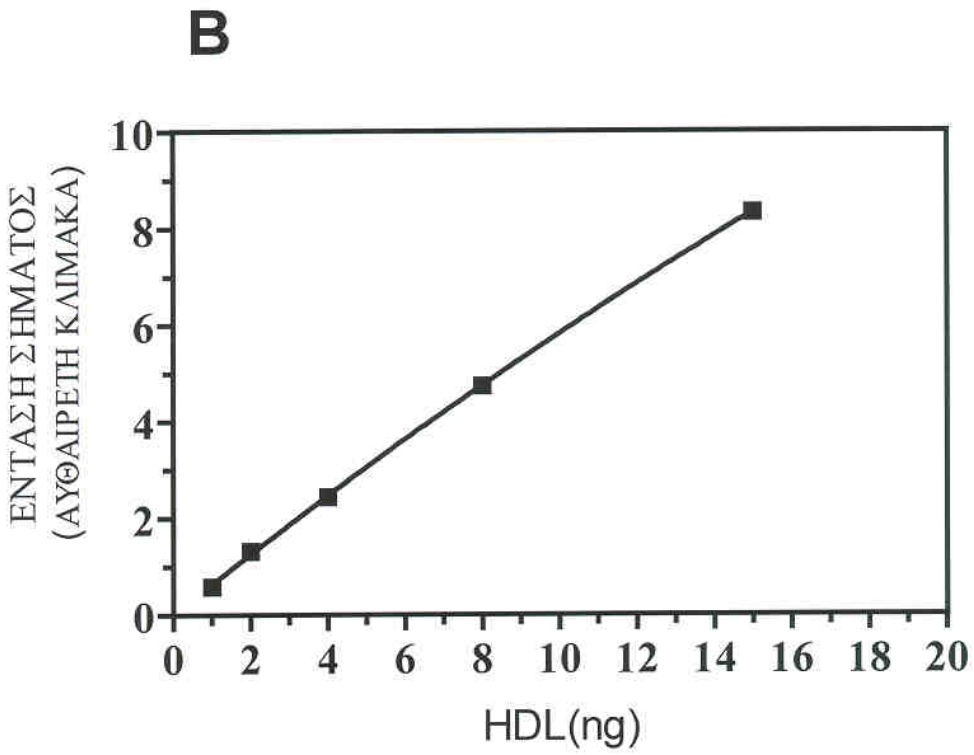
Η ανάλυση των δεδομένων δίνει τιμές για τα Kd_{app} και $Bmax_{app}$ που είναι 16.9±3.1 μg πρωτεΐνης/ml και 370±40 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα ldlA-7 εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του υποδοχέα SR-BI (118). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υπολογιζόμενες μη-ειδικές τιμές σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] είναι ίδιες με τις παρατηρούμενες ολικές τιμές σύνδεσης για τα μη-μετασχηματισμένα με cDNA του υποδοχέα SR-BI κύτταρα ldlA-7, που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα ενδογενούς υποδοχέα SR-BI.

Συμπερασματικά η νέα τεχνική του ανοσο-υποδοχέα δίνει παρόμοια αποτελέσματα με την κλασική τεχνική του ραδιο-υποδοχέα, όταν χρησιμοποιείται προσφάτως ραδιοσημασμένη HDL. Κατά συνέπεια η τεχνική του ανοσο-υποδοχέα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απλή και αποτελεσματική εναλλακτική μέθοδος για την εκτίμηση των παραμέτρων σύνδεσης διαφόρων συνδετών, χωρίς να είναι αναγκαία η ιωδίωσή τους.

ΕΙΚΟΝΑ 39 (Α, Β). Σύνδεση της σφαιρικής HDL στον υποδοχέα SR-BI με βάση την τεχνική του ανοσο-υποδοχέα. Πλαίσιο Α. Σύνδεση της HDL σε κύτταρα ldlA[mSR-BI]. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI]και ldlA-7 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6-θέσεων σε θρεπτικό μέσο Α (για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI]) και Β (για τα κύτταρα (ldlA-7), σε πυκνότητα $3*10^5$ κυττάρων ανά θέση. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις μη ραδιοσημασμένης σφαιρικής HDL (πυκνότητας 1.13 g/ml) για 1.5 ώρα, σε 37° C. Τα κυτταρικά λύματα που περιέχουν τα σύμπλοκα υποδοχέα-HDL συνελέγησαν, διαχωρίσθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (12%) και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF. Η συνδεδεμένη στον υποδοχέα HDL ανιχνεύθηκε με ανοσο-αποτύπωση, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο ενισχυμένου χημειοφθορισμού (ECL) και ποσοτικοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Image Quant. Οι ολικές τιμές σύνδεσης (που αντιπροσωπεύονται με ανοικτά τετράγωνα, □) υπολογίσθηκαν από τις τιμές της έντασης των σημάτων της αποA-I, με χρήση της γραφικής παράστασης αναφοράς του πλαισίου Β. Οι ειδικές **(●)** και οι μη-ειδικές **(○)** τιμές σύνδεσης υπολογίσθηκαν με μη-γραμμική ανάλυση, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism. Η ειδική σύνδεση αντιπροσωπεύει την διαφορά της ολικής από την μη ειδική σύνδεση. Οι υπολογισθείσες μη-ειδικές τιμές σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] είναι παρόμοιες με τις παρατηρούμενες ολικές τιμές σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA-7, που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του υποδοχέα SR-BI. **Πλαίσιο Β. Γραφική παράσταση αναφοράς της έντασης του σήματος της HDL συναρτήσει της ποσότητας της πρωτεΐνης.** Η παράσταση των ποσοτήτων της HDL σε σχέση με την έντασή τους ακολουθεί πολυνομική εξίσωση δευτέρου βαθμού.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΟΣΟ-ΥΠΟΔΟΧΕΑ





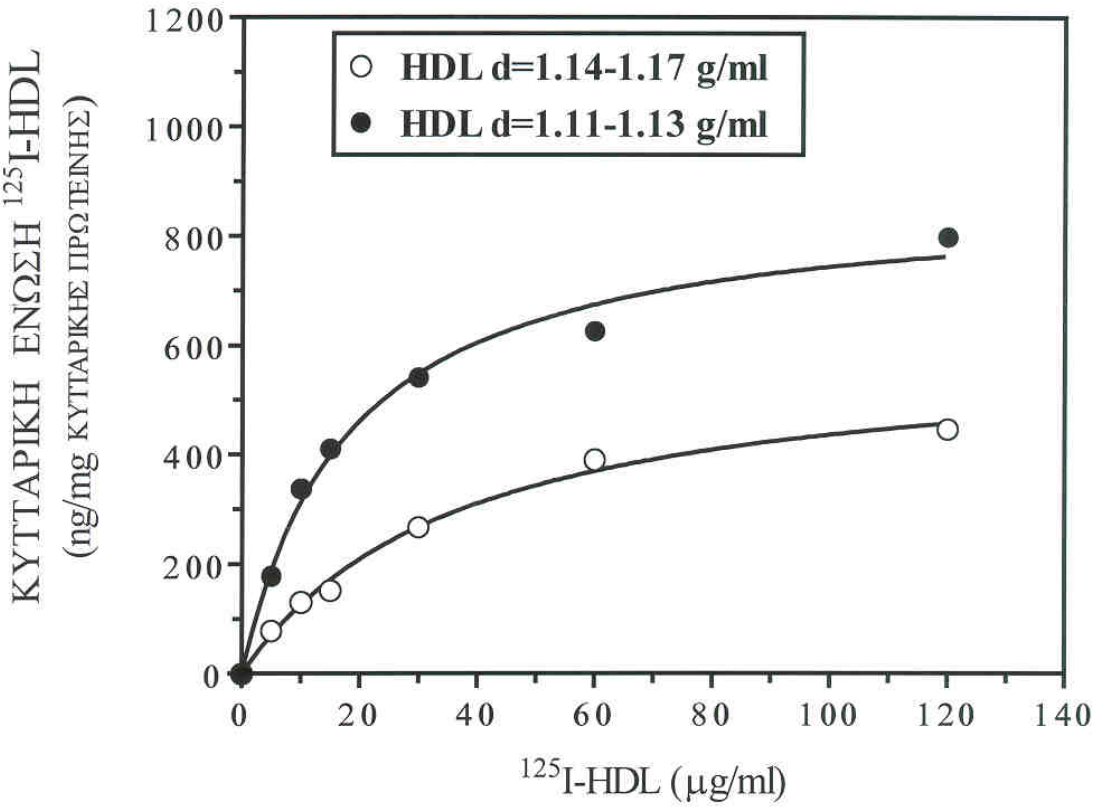
3. Επίδραση της πυκνότητας της HDL στην σύνδεση με τον υποδοχέα SR-BI

Η HDL αποτελείται από ένα μείγμα σωματιδίων με διάφορες πυκνότητες, που κυμαίνονται από 1.063-1.21 g/ml (13). Τα σωματίδια αυτά ανάλογα με την πυκνότητα τους έχουν διαφορετική απολιποπρωτεϊνική σύσταση και πιθανώς διαφορετικές ιδιότητες. Μελετήθηκε κατά πόσο η πυκνότητα των σωματιδίων της HDL επηρεάζει την συγγένεια της σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI. Για τον σκοπό αυτό απομονώθηκε η HDL του πλάσματος διαχωρίστηκε σε διάφορα κλάσματα, μετά από φυγοκέντρηση ζώνης και καθορίστηκε η πυκνότητα του κάθε κλάσματος. Τα διάφορα κλάσματα που συνελέγησαν έχουν πυκνότητα που κυμαίνεται από 1.095 σε 1.17 g/ml. Τα κλάσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν αρχικά σε πειράματα άμεσης σύνδεσης, μετά από την ραδιοσήμανσή τους με ^{125}I.

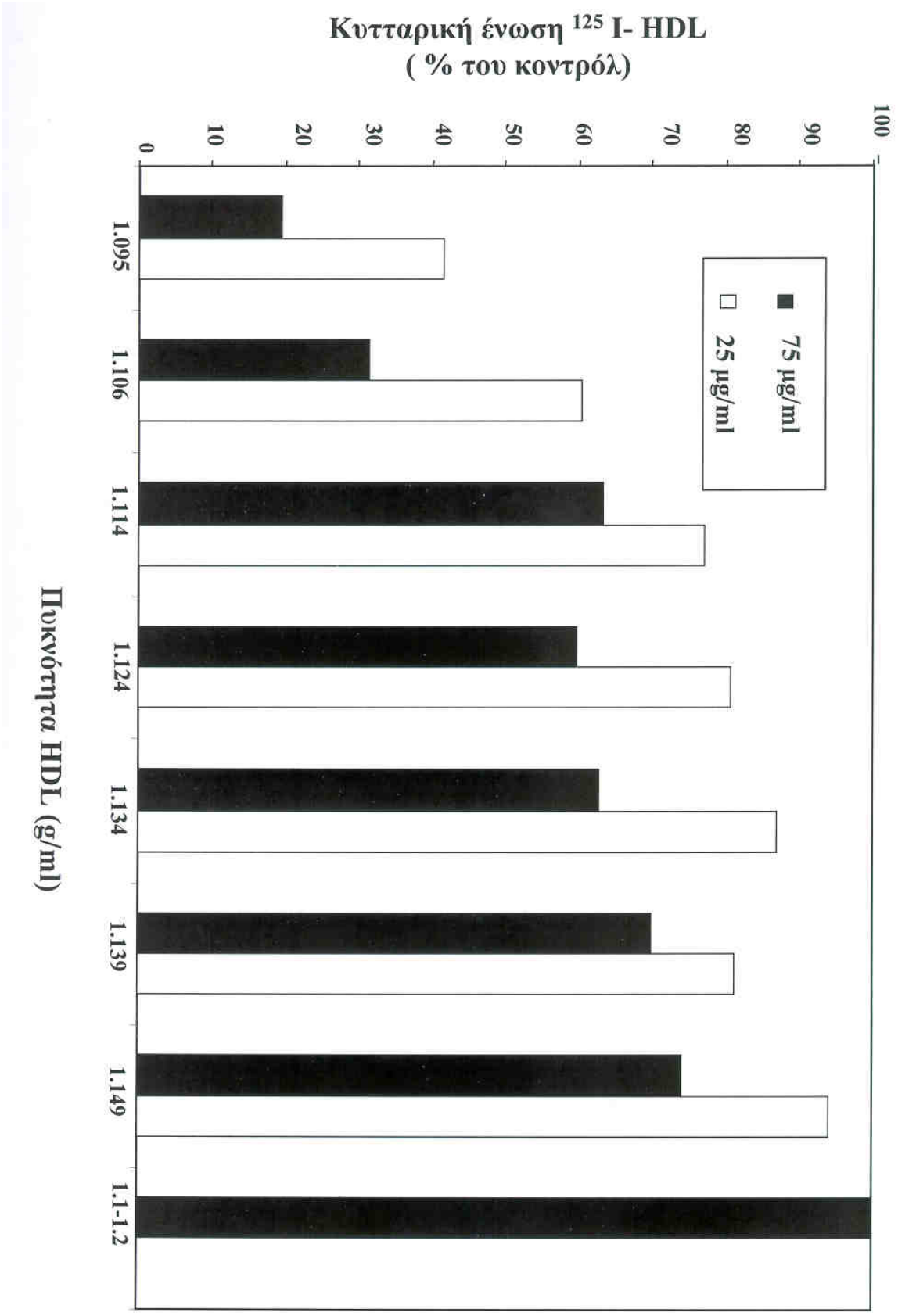
Η εικόνα 40 δείχνει την σύνδεση δύο διαφορετικών κλασμάτων HDL σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI. Τα δύο κλάσματα που χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως κλάσμα χαμηλής πυκνότητας (1.11-1.13 g/ml) και κλάσμα υψηλής πυκνότητας (1.14-1.17 g/ml) και αναλύθηκαν 15 μέρες μετά την ραδιοσήμανσή τους. Οι καμπύλες κορεσμού αντιπροσωπεύουν τις τιμές της ειδικής σύνδεσης, οι οποίες προκύπτουν μετά από την αφαίρεση της μη ειδικής σύνδεσης από την ολική σύνδεση. Η μη ειδική σύνδεση προσδιορίσθηκε με εφαρμογή μη-γραμμικής ανάλυσης, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism, όπως έχει εξηγηθεί αναλυτικά ανωτέρω. Οι τιμές της σταθεράς διάστασης Kd_{app} είναι 11±2 μg πρωτεΐνης/ml για τις ^{125}I-HDL πυκνότητας 1.11-1.13 g/ml και 37±5 μg πρωτεΐνης/ml για τις ^{125}I-HDL πυκνότητας 1.14-1.17 g/ml. Οι τιμές της $Bmax_{app}$ είναι 877±40 και 597±31 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης για το κλάσμα της χαμηλής και υψηλής πυκνότητας αντίστοιχα. Η ανάλυση αυτή φανερώνει ότι τα κλάσματα HDL με διαφορετικές πυκνότητες συνδέονται με διαφορετική συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI. Συγκεκριμένα τα κλάσματα HDL χαμηλότερης πυκνότητας έχουν μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης στον SR-BI σε σχέση με τα κλάσματα HDL υψηλής πυκνότητας.

Για περαιτέρω μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν κλάσματα HDL, με πυκνότητες που κυμαίνονται από 1.095-1.149 g/ml, σε πειράματα συναγωνισμού για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε κύτταρα ldlA[mSR-BI]. Στην εικόνα 41 φαίνεται ο συναγωνισμός των κλασμάτων HDL για την σύνδεση της ^{125}I-HDL, με πυκνότητα 1.1-1.12 g/ml σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI. Είναι εμφανές ότι η ικανότητα των κλασμάτων να συναγωνίζονται για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα μειώνεται καθώς αυξάνεται η πυκνότητα των κλασμάτων της HDL.

ΕΙΚΟΝΑ 40. Σύνδεση της σφαιρικής HDL διαφόρων πυκνοτήτων στον υποδοχέα SR-BI. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κυττάρων ανά θέση, με θρεπτικό μέσο Β, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις κλασμάτων HDL που έχουν ραδιοσημανθεί με ^{125}I, 15 ημέρες πριν από το πείραμα. Τα κλάσματα της χαμηλότερης πυκνότητας (d= 1.11- 1.13 g/ml) συμβολίζονται με κλειστούς κύκλους. Τα κλάσματα της υψηλότερης πυκνότητας (d=1.14-1.17 g/ml) συμβολίζονται με ανοικτούς κύκλους. Η κυτταρική σύνδεση της ^{125}I-HDL έγινε με μετρήσεις δειγμάτων εις διπλούν, όπως έχει περιγραφεί στο τμήμα 18Γ των μεθόδων. Στην εικόνα παριστάνονται οι ειδικές τιμές σύνδεσης, που αντιπροσωπεύουν την διαφορά της ολικής σύνδεσης, που μετρήθηκε πειραματικά, από την μη ειδική σύνδεση, η οποία υπολογίσθηκε με μη-γραμμική ανάλυση, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism.


ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΩΣΗ ^{125}I-HDL
(ng/mg ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ)
HDL d=1.14-1.17 g/ml
HDL d=1.11-1.13 g/ml
1200
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120
140
^{125}I-HDL (μg/ml)

ΕΙΚΟΝΑ 41. Αναστολή της σύνδεσης της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI από κλάσματα HDL διαφόρων πυκνοτήτων. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κυττάρων ανά θέση, με θρεπτικό μέσο Β, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με 10 μg πρωτεΐνης/ml ^{125}I-HDL, πυκνότητας 1.1-1.2 g/ml παρουσία μη ραδιοσημασμένων κλασμάτων σφαιρικής HDL που φέρουν τις αναγραφόμενες πυκνότητες (g/ml), σε συγκεντρώσεις είτε 25 μg/ml (μαύρες στήλες) ή 75 μg/ml (άσπρες στήλες). Οι τιμές που αναγράφονται είναι οι μέσες τιμές μετρήσεων εις διπλούν και παριστάνουν την κυτταρική σύνδεση της ^{125}I-HDL ως ποσοστό % της τιμής της κυτταρικής σύνδεσης απουσία συναγωνιστών (μη ραδιοσημασμένα κλάσματα HDL). Η τιμή σύνδεσης απουσία μη ραδιοσημασμένης HDL ορίζεται ως 100% και είναι 162 ng πρωτεΐνης ^{125}I-HDL ανά mg κυτταρικής πρωτεΐνης.


Κυτταρική ένωση 125 I- HDL
(% του κοντρόλ)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
75 μg/ml
25 μg/ml
1.095
1.106
1.114
1.124
1.134
1.139
1.149
1.1-1.2
Πυκνότητα HDL (g/ml)

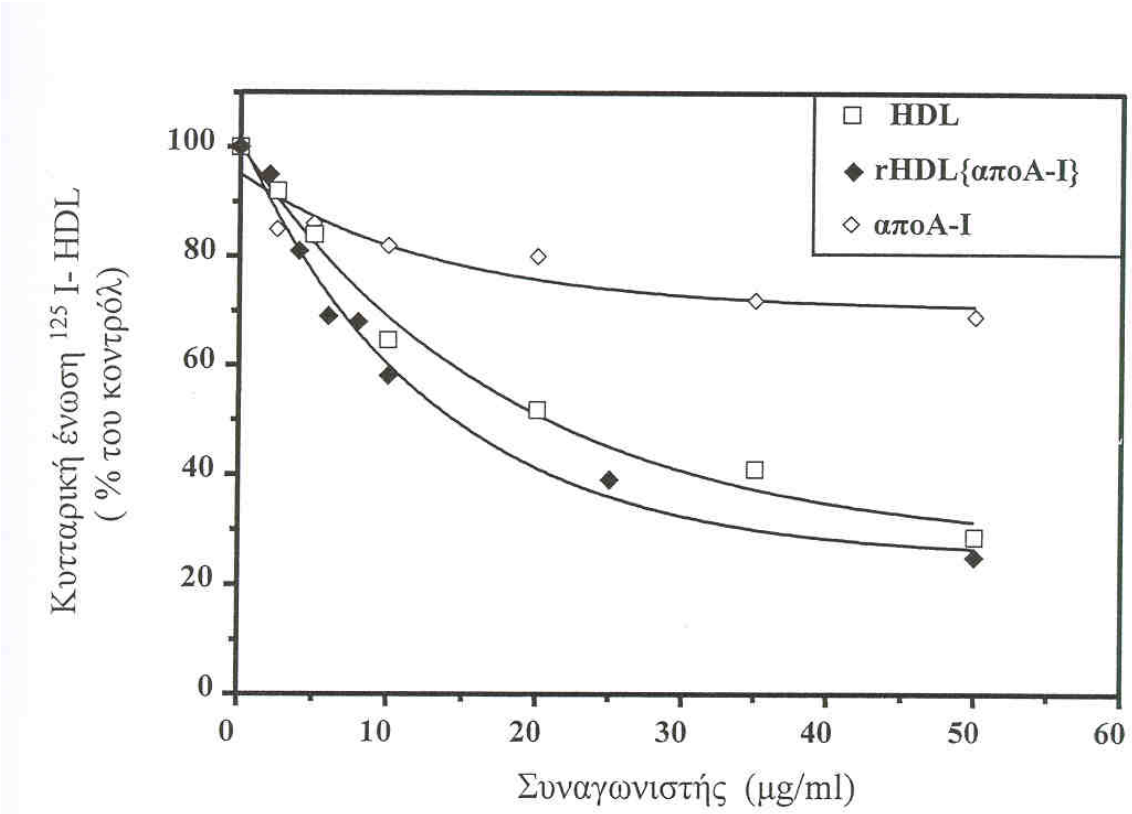
Β) Σύνδεση της αποΑ-Ι στον υποδοχέα SR-BI

Από την παραπάνω ανάλυση φαίνεται ότι η πυκνότητα της σφαιρικής HDL επηρεάζει την συγγένεια σύνδεσής της στον υποδοχέα SR-BI. Είναι γνωστό ότι η πυκνότητα των διαφόρων κλασμάτων της HDL μπορεί να αντανακλά διαφορετική σύσταση σε απολιποπρωτεΐνες και λιπίδια. Τα κλάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στα προαναφερθέντα πειράματα είναι σφαιρικού σχήματος και μπορεί να περιέχουν 2-4 μόρια πρωτεΐνης αποΑ-Ι (13). Εχαρακτηρίσθηκε η σύνδεση της κύριας απολιποπρωτεΐνης της HDL, της αποΑ-Ι, με τον υποδοχέα SR-BI, μελετώντας κατ' αρχήν την επίδραση των λιπιδίων στην ικανότητα σύνδεσης στον υποδοχέα.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα άμεσης σύνδεσης και συναγωνισμού, χρησιμοποιώντας πρωτεΐνη αποΑ-Ι, που έχει απομονωθεί από πλάσμα, είτε σε μορφή ελεύθερη λιπιδίων, είτε σε μορφή δισκοειδών σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL), που περιέχουν POPC και χοληστερόλη. Τα σωματίδια παρασκευάσθηκαν με την μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου, χρησιμοποιώντας είτε μη-ραδιοσημασμένη αποΑ-Ι, είτε ^{125}I-αποΑ-Ι, δύο μέρες μετά την ραδιοσήμανσή της. Τα σωματίδια rHDL χαρακτηρίσθηκαν με ανάλυση σε βαθμιδωτό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (8-25%) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τα σωματίδια rHDL έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT, με την διαφορά ότι η χοληστερόλη που περιείχαν δεν ήταν ραδιοσημασμένη. Η πλειονότητα των σωματιδίων rHDL έχει διάμετρο 96-104 Å, ενώ υπάρχουν και λιγότερα ποσά μεγαλυτέρων μορφών με διάμετρο περίπου 120 Å.

Η εικόνα 42 δείχνει τον συναγωνισμό για την σύνδεση ^{125}I-HDL (πυκνότητας 1.14 g/ml) σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI από την πρωτεΐνη αποΑ-Ι, από δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποΑ-Ι}, καθώς και από σφαιρική HDL (πυκνότητας 1.14 g/ml). Φαίνεται ότι η αποΑ-Ι σε μορφή ελεύθερη λιπιδίων συναγωνίζεται ασθενώς για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI, σε σχέση με την σφαιρική HDL, ενώ τα δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποΑ-Ι} συναγωνίζονται ισχυρότερα για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI, σε σχέση με την σφαιρική HDL, σε συγκεντρώσεις συναγωνιστή που κυμαίνονται από 2-50 μg/ml. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από έξι ανεξάρτητα πειράματα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπό τις συνθήκες του πειράματος (θερμοκρασία 37^{o} C), η μη-ραδιοσημασμένη αποΑ-Ι (συναγωνιστής) έχει την ικανότητα να αντικαταστήσει την ραδιοσημασμένη αποΑ-Ι στην σφαιρική HDL. Επομένως η μείωση της σύνδεσης της ^{125}I-HDL είναι πιθανό να αντιπροσωπεύει

ΕΙΚΟΝΑ 42. Αναστολή της σύνδεσης σφαιρικής ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI από την αποA-I, και δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος (rHDL{αποA-I}). Την ημέρα 0, κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κύτταρα ανά θέση. Την ημέρα 2, τα κύτταρα επωάσθηκαν με ^{125}I-HDL (5 μg πρωτεΐνη/ml) (πυκνότητας 1.14 g/ml) με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της σφαιρικής HDL (πυκνότητας 1.14 g/ml), ελεύθερη λιπιδίων αποA-I, και δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποA-I}. Οι τιμές που δίνονται αποτελούν τις μέσες τιμές μετρήσεων δειγμάτων εις διπλούν και αποτελούν % ποσοστά της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών (Το 100% της τιμής της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών, είναι 152 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης).


HDL
rHDL{αποA-I}
αποA-I
Κυτταρική ένωση ^{125}I- HDL
(% του κοντρόλ)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
Συναγωνιστής (μg/ml)

αραίωση της ειδικής ενεργότητας της ^{125}I-HDL.

Για τον επακόλουθο καθορισμό των χαρακτηριστικών της σύνδεσης της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI (όπως των τιμών Kd_{app} και $Bmax_{app}$) έγιναν πειράματα άμεσης σύνδεσης. Χρησιμοποιήθηκαν δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν αποA-I (rHDL{αποA-I}), καθώς και ελεύθερη λιπιδίων αποA-I. Η σύνδεση των rHDL{αποA-I} στον υποδοχέα SR-BI μελετήθηκε και με τις δύο τεχνικές, ραδιο-υποδοχέα και ανοσο-υποδοχέα. Κύτταρα μάρτυρες ldlA-7, και κύτταρα ldlA[mSR-BI], που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI του ποντικού επωάσθηκαν απουσία μη ραδιοσημασμένης HDL ή παρουσία μη ιχνοθετημένης HDL, 40 φορές πολλαπλάσιας μάζας. Οι μετρήσεις απουσία της HDL έγιναν εις διπλούν και επέτρεψαν τον καθορισμό της ολικής σύνδεσης (ειδικής και μη ειδικής). Οι μετρήσεις παρουσία της περίσσειας μη ιχνοθετημένης HDL έγιναν σε ένα δείγμα και έδωσαν την τιμή της μη ειδικής κυτταρικής πρόσδεσης στο συγκεκριμένο πειραματικό σημείο. Οι τιμές της μη ειδικής κυτταρικής σύνδεσης υπολογίσθηκαν επίσης με βάση τις ολικές τιμές σύνδεσης με εφαρμογή μη γραμμικής ανάλυσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prism, και συμφωνούν με τις τιμές σύνδεσης που προκύπτουν παρουσία περίσσειας μη ραδιοσημασμένης HDL. Για την λήψη των καμπύλων κορεσμού (saturation curves) χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της ειδικής κυτταρικής σύνδεσης. Οι τιμές αυτές προκύπτουν από την αφαίρεση των τιμών της μη ειδικής σύνδεσης που υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα Prism από τις τιμές της ολικής κυτταρικής πρόσδεσης. Οι τιμές σύνδεσης εκφράζονται σε ng πρωτεΐνης συνδεδεμένης με τα κύτταρα ανά mg της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης.

Η εικόνα 43 (πλαίσιο A) δείχνει την σύνδεση δισκοειδών σωματιδίων rHDL που περιέχουν αποA-I σε κύτταρα που εκφράζουν SR-BI, ldlA[mSR-BI], και κύτταρα ldlA-7, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα σωματίδια rHDL{αποA-I} εμφανίζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης που οδηγεί σε κορεσμό σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI. Η σύνδεση των rHDL{αποA-I} στα μη μετασχηματισμένα κύτταρα μάρτυρες ldlA-7 είναι πολύ περιορισμένη. Η τιμή της σταθεράς διάστασης Kd_{app} είναι 1.5±0.4 μg πρωτεΐνης ανά ml και η τιμή $Bmax_{app}$ αντιστοιχεί σε 350±10 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Τα δεδομένα συμφωνούν με το μοντέλο σύνδεσης της αποA-I σε μια κατηγορία θέσεων στο μόριο του SR-BI.

Τα δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποA-I} χρησιμοποιήθηκαν επίσης σε πειράματα σύνδεσης με την τεχνική του ανοσο-υποδοχέα. Η εικόνα 43 (πλαίσιο B) παρουσιάζει την σύνδεση σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και κύτταρα μάρτυρες ldlA-7. Τα σωματίδια

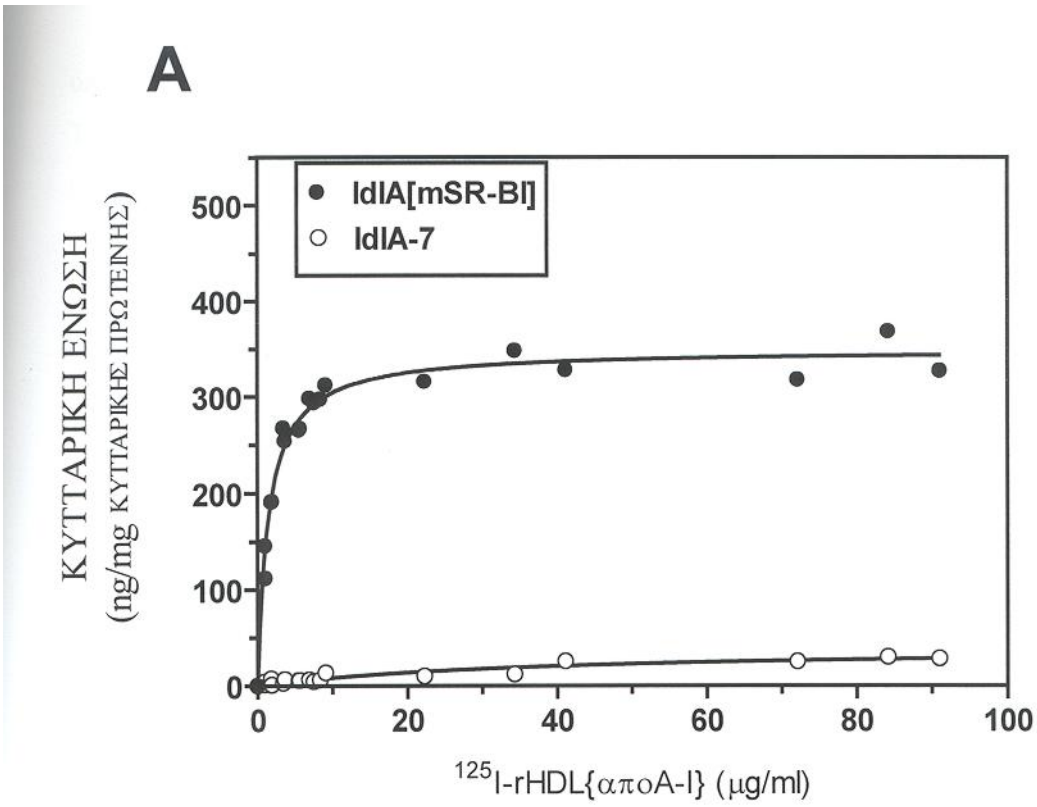
rHDL{αποA-I} συνδέονται με υψηλή συγγένεια σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI, ενώ η σύνδεση στα μη-μετασχηματισμένα κύτταρα είναι πολύ περιορισμένη. Η τιμή της σταθεράς διάστασης Kd_{app} είναι 0.5±0.1 μg πρωτεΐνης/ml και της $Bmax_{app}$ είναι 550±10 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης.

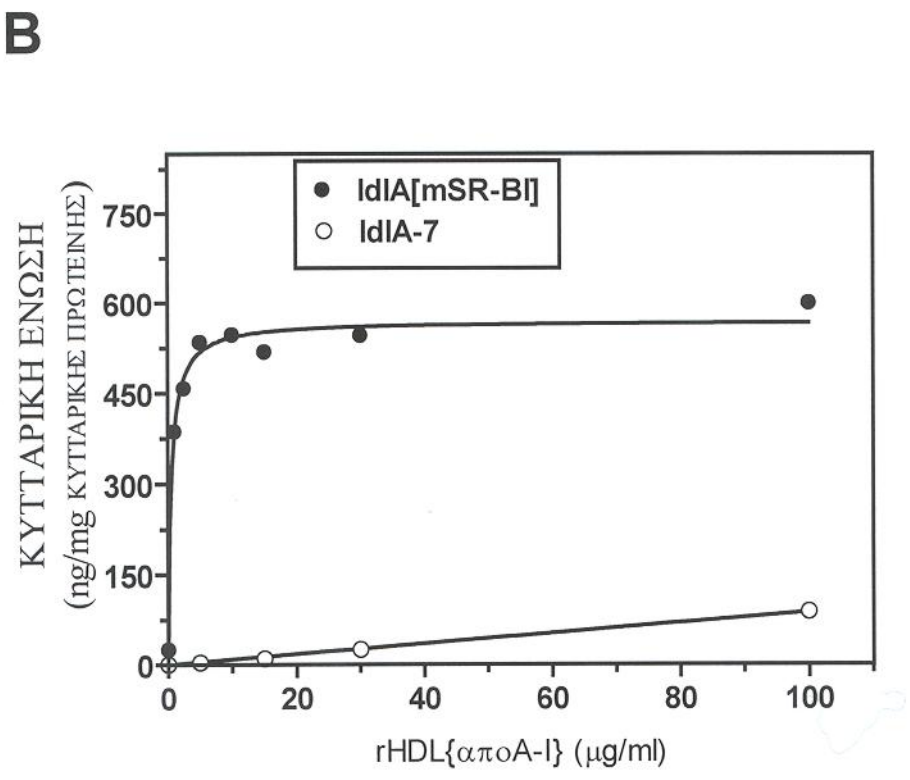
Συμπερασματικά η αποA-I, υπό την μορφή δισκοειδών σωματιδίων συνδέεται με υψηλή συγγένεια που οδηγεί σε κορεσμό σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI. Οι διαφορές στις τιμές της $Bmax_{app}$ που λαμβάνονται με τις μεθόδους του ραδιο-υποδοχέα και ανοσο-υποδοχέα μπορεί να οφείλονται στην διαφορετική έκφραση του SR-BI στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα διαφορετικά πειράματα. Οι τιμές της Kd_{app} που ελήφθησαν με την μέθοδο του ραδιο-υποδοχέα και ανοσο-υποδοχέα δεν διαφέρουν στατιστικά. Τα δεδομένα φανερώνουν ότι η συγγένεια σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI των δισκοειδών σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος είναι τουλάχιστον 10-πλάσια της συγγένειας της σφαιρικής HDL (πυκνότητας 1.13 g/ml).

Οι τιμές της σταθεράς διάστασης Kd_{app} όταν εκφραστούν σε nM ισοδύναμα της αποA-I δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα έχει υπολογισθεί ότι η HDL_2 περιέχει 4 μόρια αποA-I (13), η HDL_3 περιέχει 3 μόρια αποA-I, και τα δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποA-I} διαμέτρου 96 περιέχουν 2 μόρια αποA-I (140). Έτσι οι τιμές 16.9 και 1.5 μg πρωτεΐνης/ml για την HDL_2 και rHDL{αποA-I} αντιστοιχούν σε 600 και 26 nM ισοδύναμα της αποA-I αντίστοιχα. Με την μετατροπή αυτή η διαφορά στην συγγένεια μεταξύ των rHDL{αποA-I} και HDL γίνεται ακόμη μεγαλύτερη (23-πλάσια αντί 10-πλάσια).

Έγιναν επίσης πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια POPC: χοληστερόλης, (αναλογία 2: 1), χωρίς να περιέχουν πρωτεΐνη αποA-I. Τα σωματίδια αυτά δεν συνδέονται στον υποδοχέα SR-BI. Αυτό δείχνει ότι η σύνδεση με υψηλή συγγένεια των rHDL{αποA-I} στον SR-BI εξαρτάται από την παρουσία της αποA-I, λόγω της άμεσης σύνδεσης της αποA-I με τον υποδοχέα SR-BI.

ΕΙΚΟΝΑ 43 (Α, Β). Πλαίσιο Α. Σύνδεση δισκοειδών σωματιδίων ^{125}I-rHDL{αποA-I} σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κυττάρων ανά θέση, με θρεπτικό μέσο Β και Α αντίστοιχα, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις ραδιοσημασμένων σωματιδίων rHDL{αποA-I}. Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] παριστάνονται με κλειστούς κύκλους (●) και υπολογίσθηκαν με μη γραμμική ανάλυση, όπως εξηγείται στην εικόνα 40. Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA-7 παριστάνονται με ανοικτούς κύκλους (❍). Οι τιμές σύνδεσης εκφράζονται σε ng αποA-I συνδεδεμένης με κύτταρα ανά mg της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης. **Πλαίσιο Β. Σύνδεση δισκοειδών σωματιδίων rHDL{αποA-I} σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7.** Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI]και ldlA7 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6-θέσεων σε θρεπτικό μέσο Α και Β αντίστοιχα, σε πυκνότητα 3*10^5 κυττάρων ανά θέση. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των rHDL{αποA-I}. Τα κυτταρικά λύματα που περιέχουν τα σύμπλοκα υποδοχέα-αποA-I διαχωρίσθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (12%) και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF. Η αποA-I που είχε συνδεθεί στον υποδοχέα ανιχνεύθηκε με ανοσο-αποτύπωση και ποσοτικοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Image Quant. Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] παριστάνονται με κλειστούς κύκλους (●) και για τα κύτταρα ldlA-7 παριστάνονται με ανοικτούς κύκλους (❍) και υπολογίσθηκαν με μη γραμική ανάλυση, όπως εξηγείται στην εικόνα 39.


A
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΩΣΗ
(ng/mg ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ)
IdlA[mSR-BI]
IdlA-7
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
125I-rHDL{αποA-I} (μg/ml)

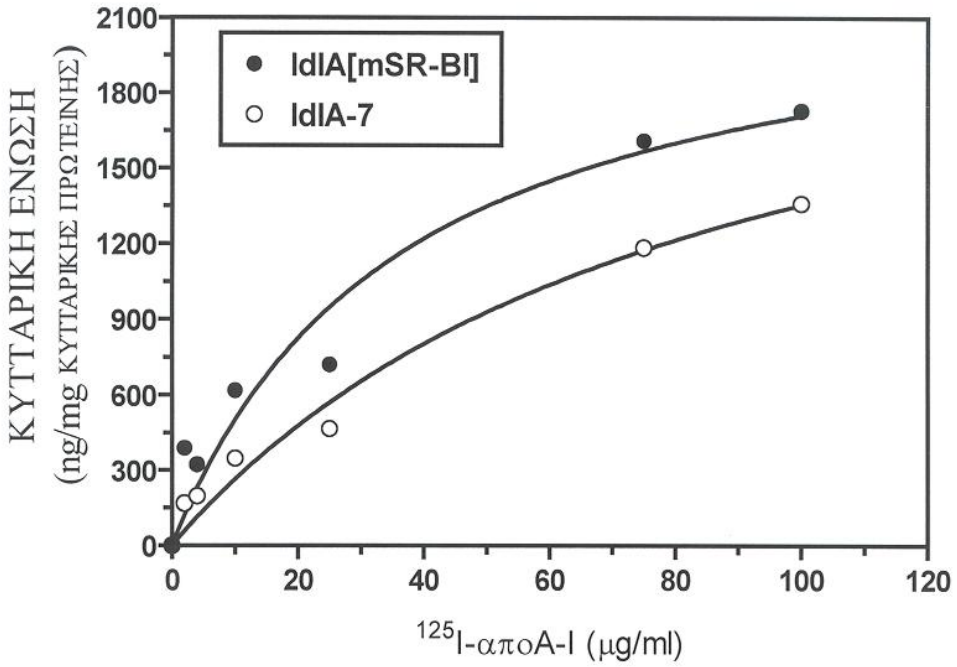

B
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΩΣΗ
(ng/mg ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ)
IdlA[mSR-BI]
IdlA-7
750
600
450
300
150
0
0
20
40
60
80
100
rHDL{αποA-I} (μg/ml)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η σύνδεση της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I στον υποδοχέα SR-BI, με χρήση των τεχνικών του ραδιο-υποδοχέα και του ανοσο-υποδοχέα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 44. Στην εικόνα 44 (πλαίσιο Α) παριστάνεται η ειδική σύνδεση της ραδιοσημασμένης με ^{125}I αποA-I σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και κύτταρα μάτρυρες ldlA-7 (τεχνική ραδιο-υποδοχέα). Στην εικόνα 44 (πλαίσιο Β) παριστάνεται η ειδική σύνδεση μη ραδιοσημασμένης αποA-I σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και μη-μετασχηματισμένα κύτταρα ldlA-7 (τεχνική ανοσο-υποδοχέα). Φαίνεται ότι η ελεύθερη λιπιδίων αποA-I συνδέεται σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI του ποντικού, αλλά η σύνδεση δεν οδηγεί σε κορεσμό. Η ελεύθερη λιπιδίων αποA-I επίσης συνδέεται και σε κύτταρα μάρτυρες, ldlA-7, ακολουθώντας παρόμοια καμπύλη σύνδεσης που παρατηρείται και στα μετασχηματισμένα κύτταρα με το cDNA του υποδοχέα SR-BI. Η εικόνα 44 (A, B) δείχνει τα πιο αντιπροσωπευτικά πειράματα. Η συμπεριφορά της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I είναι εμφανώς πολύ διαφορετική από αυτή των σωματιδίων rHDL{αποA-I} της εικόνας 43 (A, B). Τα δεδομένα που υπάρχουν δεν μπορούν να επιβεβαιώσουν την ειδική σύνδεση της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I στον υποδοχέα SR-BI.

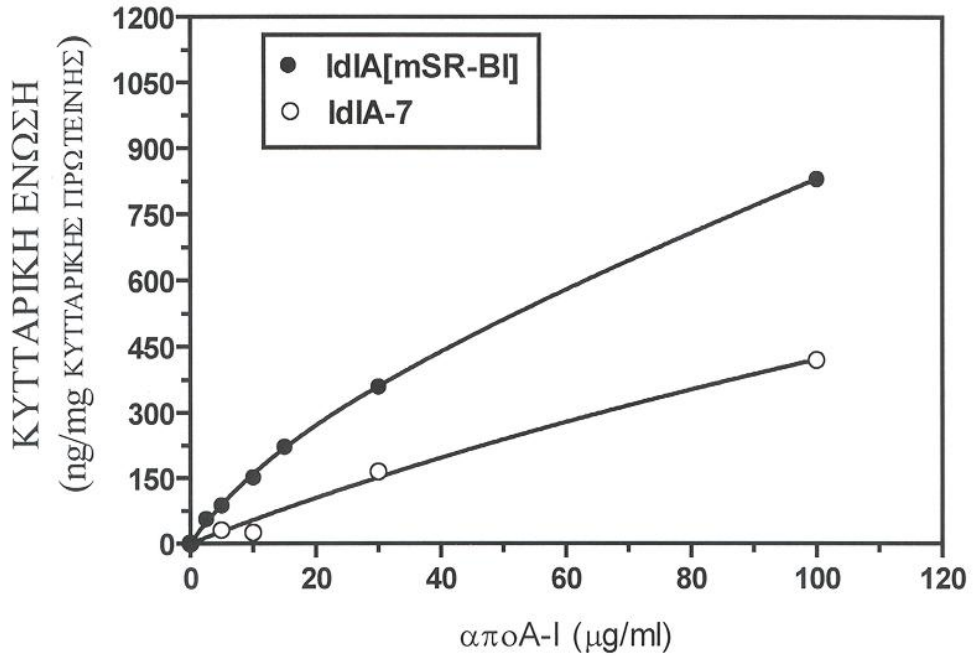
Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι έγιναν και πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε η φυσιολογική μορφή της πρόδρομης HDL, που ονομάζεται πρε-β-1 HDL, και αποτελείται από αποA-I ενωμένη με μικρή ποσότητα φωσφολιπιδίων. Η πρε-β-1 HDL χρησιμοποιήθηκε τόσο σε πειράματα συναγωνισμού για την σύνδεση ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI, όσο και σε πειράματα άμεσης σύνδεσης (με τις τεχνικές του ραδιο-υποδοχέα και του ανοσο-υποδοχέα). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι και η πρε-β-1 HDL δεν συνδέεται ειδικά στον υποδοχέα SR-BI και συναγωνίζεται ασθενώς για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον εν λόγω υποδοχέα.

ΕΙΚΟΝΑ 44 (Α, Β). Πλαίσιο Α. Σύνδεση της ^{125}I-αποΑ-Ι σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κυττάρων ανά θέση, με θρεπτικό μέσο Β και Α αντίστοιχα, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ραδιο-σημασμένης ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι. Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] παριστάνονται με κλειστούς κύκλους (●) και υπολογίσθηκαν με μη γραμμική ανάλυση, όπως εξηγείται στην εικόνα 40. Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA-7 παριστάνονται με ανοικτούς κύκλους (❍). Οι τιμές σύνδεσης εκφράζονται σε ng αποΑ-Ι συνδεδεμένης με τα κύτταρα ανά mg της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης. **Πλαίσιο Β. Σύνδεση της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7.** Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI]και ldlA7 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6-θέσεων σε θρεπτικό μέσο Α (για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI]) και Β (για τα κύτταρα (ldlA-7), σε πυκνότητα 3*10^5 κυττάρων ανά θέση. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ελεύθερης λιπιδίων αποΑ-Ι. Τα κυτταρικά λύματα που περιέχουν τα σύμπλοκα υποδοχέα-αποΑ-Ι διαχωρίσθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (12%) και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF. Η αποΑ-Ι που είχε συνδεθεί στον υποδοχέα ανιχνεύθηκε με ανοσο-αποτύπωση και ποσοτικοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Image Quant. Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] παριστάνονται με κλειστούς κύκλους (●) και για τα κύτταρα ldlA-7 παριστάνονται με ανοικτούς κύκλους (❍) και υπολογίσθηκαν με μη γραμική ανάλυση, όπως εξηγείται στην εικόνα 39.

A


ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΩΣΗ
(ng/mg ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ)
IdlA[mSR-BI]
IdlA-7
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
0
20
40
60
80
100
120
125I-αποA-I (μg/ml)

B

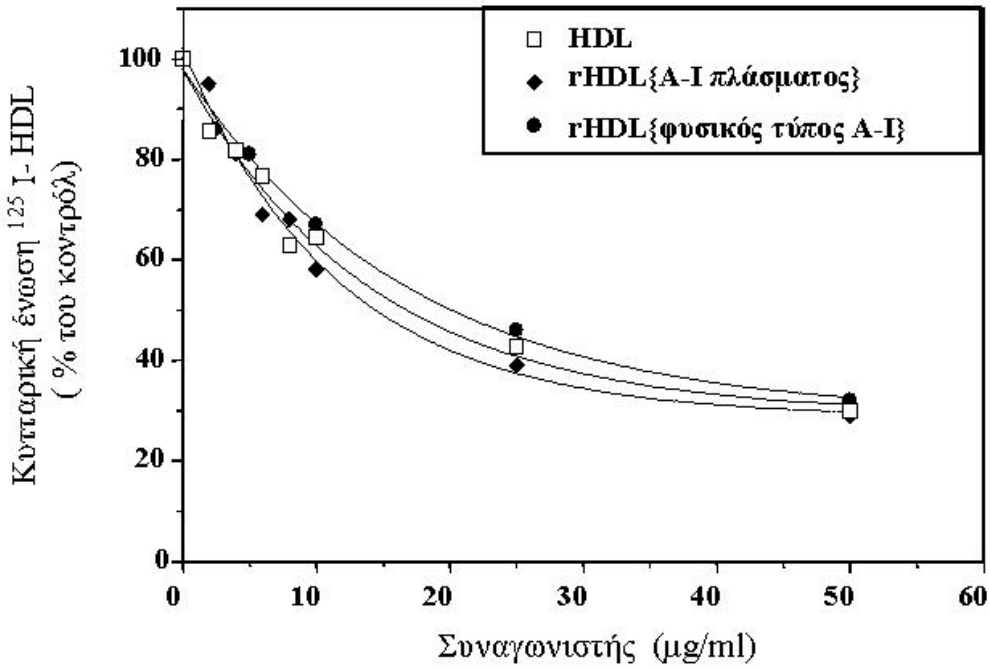

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΩΣΗ
(ng/mg ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ)
IdlA[mSR-BI]
IdlA-7
1200
1050
900
750
600
450
300
150
0
0
20
40
60
80
100
120
αποA-I (μg/ml)

Γ. Επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I στην σύνδεση με τον υποδοχέα SR-BI

Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των πειραμάτων που έχουν περιγραφεί προηγουμένως, καθώς και σε προηγούμενες μελέτες (21) είναι ότι η αποA-I είναι συνδέτης για τον υποδοχέα SR-BI. Αυτό οδήγησε στο ερώτημα αν υπάρχουν ειδικές περιοχές στο μόριο της αποA-I σημαντικές για την αναγνώριση της από τον υποδοχέα SR-BI. Για το σκοπό αυτό μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα άμεσης σύνδεσης και συναγωνισμού στην σύνδεση ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI. Με βάση το γεγονός ότι η υψηλής συγγένειας σύνδεση της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI επιτυγχάνεται όταν η αποA-I είναι υπό την μορφή των δισκοειδών σωματιδίων, οι μεταλλαγμένες μορφές χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή σωματιδίων rHDL, με POPC και χοληστερόλη, με την μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου. Μετά την παρασκευή τους τα σωματίδια διαχωρίστηκαν από την περίσσεια αποA-I ελεύθερης λιπιδίων (που δεν έχει ενσωματωθεί στα σωματίδια) με κλασμάτωση σε στήλη χρωματογραφίας FPLC, ή μετά από διάλυση με μεμβράνες διαπίδυσης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν την έξοδο μορίων μοριακής μάζας <50 KDa, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους.

Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, όπως έχει αναφερθεί, εκκρίνονται από τα C127 κύτταρα και περιέχουν το προπεπτίδιο των 6 αμινοξέων. Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση του προπεπτιδίου στην ικανότητα σύνδεσης των σωματιδίων rHDL{αποA-I} στον υποδοχέα SR-BI. Το πείραμα συναγωνισμού της εικόνας 45 φανερώνει ότι τα δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος (ώριμη μορφή 243 αμινοξέων) και την προ-αποA-I μορφή (φυσικός τύπος που εκκρίνεται από C127 κύτταρα) συναγωνίζονται εξίσου ισχυρά για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI συγκριτικά με την σφαιρική HDL. Αυτό φανερώνει ότι η παρουσία του προπεπτιδίου δεν επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα σύνδεσης των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI.

ΕΙΚΟΝΑ 45. Αναστολή της σύνδεσης σφαιρικής ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI από δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος και τον φυσικό τύπο αποA-I. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κύτταρα ανά θέση. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν με ^{125}I-HDL (5 μg πρωτεΐνη/ml, πυκνότητας 1.112 g/ml) με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της σφαιρικής HDL (πυκνότητας 1.112 g/ml), και δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος ή τον φυσικό τύπο της αποA-I (προ-αποA-I). Οι τιμές που δίνονται αποτελούν τις μέσες τιμές μετρήσεων δειγμάτων εις διπλούν και αποτελούν % ποσοστό της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών (Το 100% της τιμής της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών είναι 372 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης).



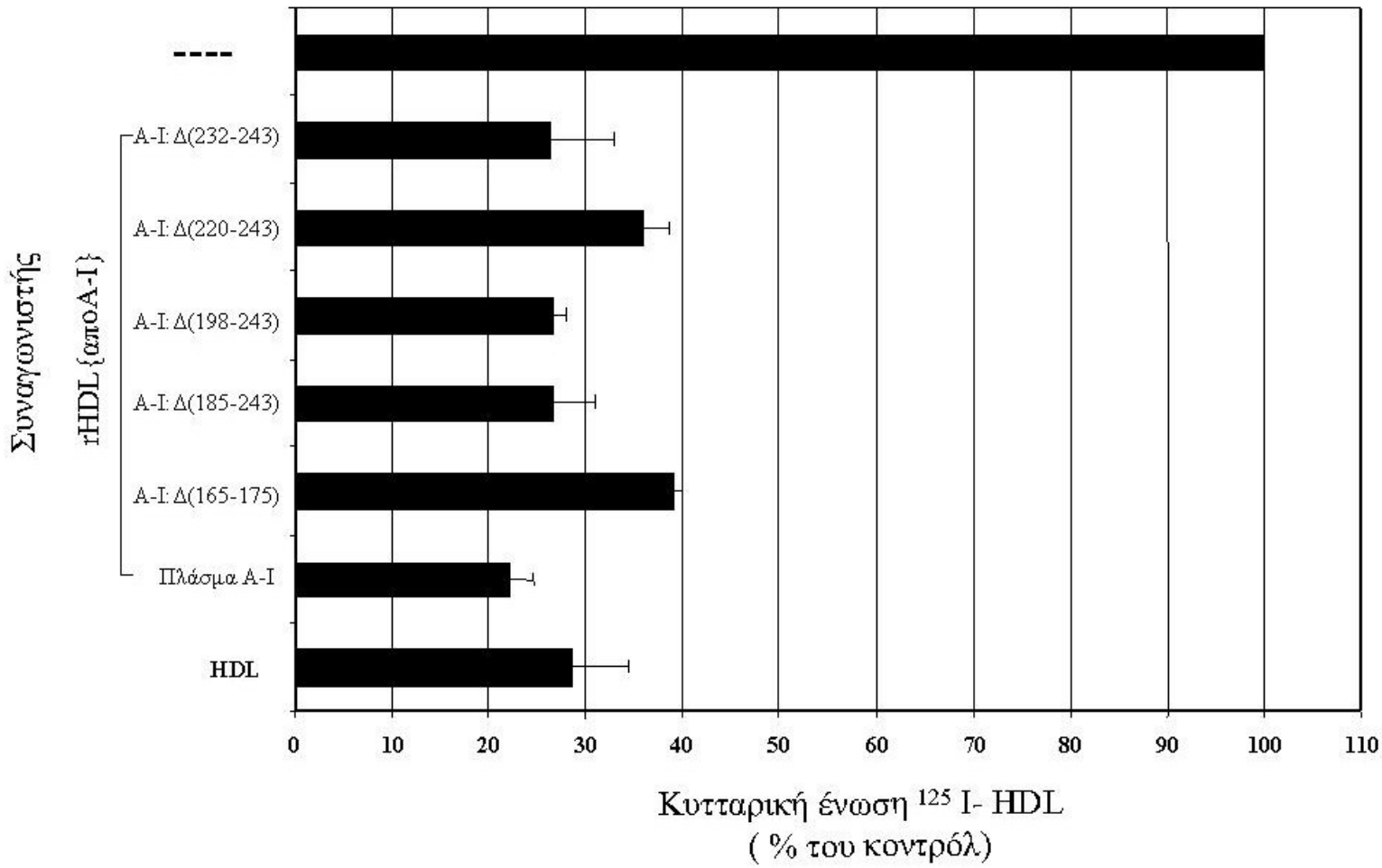
252

ΕΙΚΟΝΑ 45

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I σε πειράματα συναγωνισμού για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI. Η εικόνα 46 φανερώνει ότι η HDL και τα σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος συναγωνίζονται για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε ποσοστό 28% και 22% αντίστοιχα. Τα σωματίδια rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(165→175) συναγωνίζονται για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε ποσοστό 39%. Τέλος όλα τα σωματίδια rHDL που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I που φέρουν καρβοξυτελικές απαλοιφές συναγωνίζονται ισχυρά για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI. Συγκεκριμένα τα σωματίδια rHDL που περιέχουν τις αποA-I: Δ(185→243), αποA-I: Δ(198→243), αποA-I: Δ(220→243) και αποA-I: Δ(232→243) συναγωνίζονται για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε ποσοστά 26%, 27%, 36% και 26% αντίστοιχα (το 100% αντιστοιχεί στην σύνδεση της ^{125}I-HDL απουσία ανταγωνιστών). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η απαλοιφή του καρβοξυτελικού άκρου της αποA-I, πέρα του αμινοξέος 185, δεν επηρεάζει αισθητά την ικανότητα αναγνώρισης της πρωτεΐνης, υπό την μορφή σωματιδίων rHDL, από τον υποδοχέα SR-BI. Τα σωματίδια rHDL που περιέχουν τις μεταλλαγές αποA-I: Δ(185→243) και αποA-I: Δ(198→243) χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις σε πειράματα συναγωνισμού, τα οποία δίνονται στην εικόνα 47. Τα πειράματα αυτά δείχνουν ότι τα σωματίδια rHDL που περιέχουν τις αποA-I: Δ(185→243) και αποA-I: Δ(198→243) συναγωνίζονται ισχυρότερα για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI σε όλες τις συγκεντρώσεις από 2 ως 50 μg/ml, συγκριτικά με την σφαιρική HDL.

Η ικανότητα των σωματιδίων rHDL που περιέχουν την καρβοξυτελική απαλοιφή αποA-I: Δ(185→243) να συναγωνίζονται για την πρόσδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI επιβεβαιώθηκε με πείραμα άμεσης σύνδεσης, με χρήση της μεθόδου του ανοσο-υποδοχέα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 48, τα σωματίδια rHDL{αποA-I: Δ(185→243)} εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια σύνδεσης σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] που οδηγεί σε κορεσμό, ενώ η σύνδεση των εν λόγω σωματιδίων σε κύτταρα μάρτυρες, ldlA-7, είναι περιορισμένη. Οι τιμές του Kd_{app} είναι 3.23±0.5 μg πρωτεΐνης/ml και του $Bmax_{app}$ είναι 326±10 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με την σύνδεση της αποA-I σε μία κατηγορία θέσεων στον υποδοχέα SR-BI.

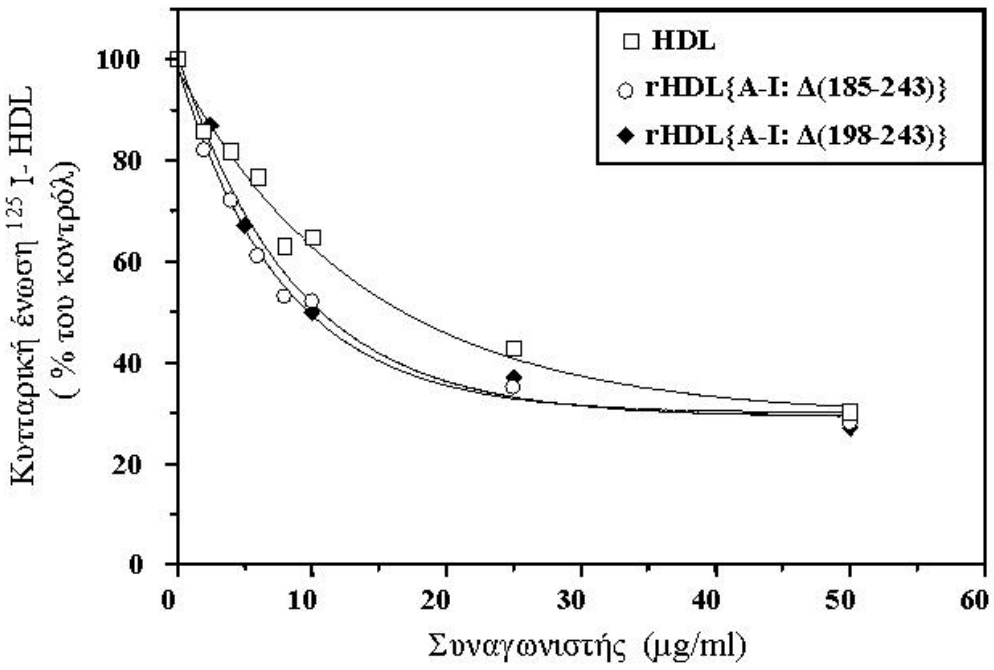
ΕΙΚΟΝΑ 46. Αναστολή της σύνδεσης σφαιρικής ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI από δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κυττάρων ανά θέση, με θρεπτικό μέσο Β, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με ^{125}I-HDL, (3 μg πρωτεΐνης/ml, πυκνότητας 1.118 g/ml) παρουσία δισκοειδών σωματιδίων που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, σε συγκέντρωση 50 μg/ml. Οι τιμές που δίνονται αποτελούν τις μέσες τιμές μετρήσεων δειγμάτων εις διπλούν και και παριστάνουν την κυτταρική σύνδεση της ^{125}I-HDL ως ποσοστό % της σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών (Το 100% της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL απουσία συναγωνιστών αντιστοιχεί σε 230-308 ng πρωτεΐνης ανά mg κυτταρικής πρωτεΐνης). Το μέγεθος της τυπικής απόκλισης (standard deviation) βασίζεται σε 4 έως 8 πειράματα.



ΕΙΚΟΝΑ 46

255

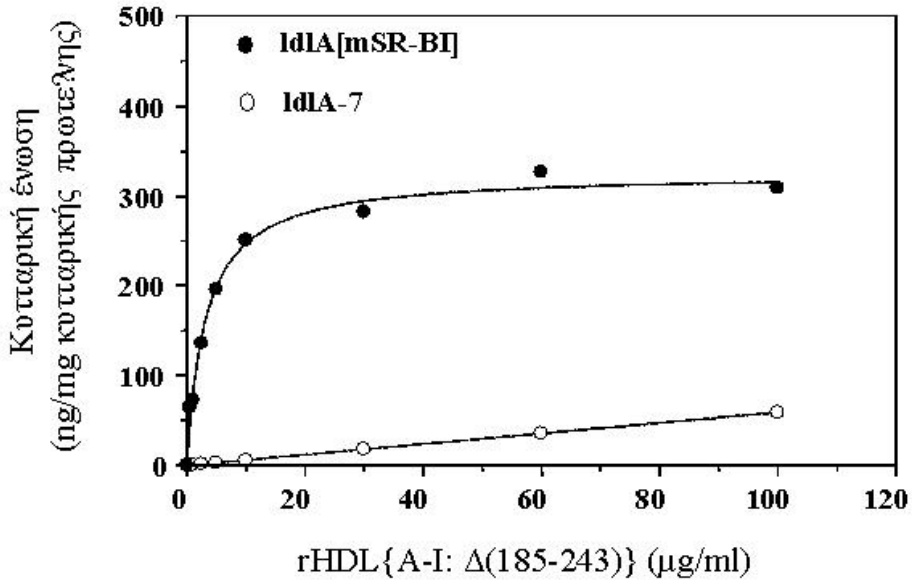
ΕΙΚΟΝΑ 47. Αναστολή της σύνδεσης σφαιρικής ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI από δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κύτταρα ανά θέση. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν με ^{125}I-HDL (5 μg πρωτεΐνη/ml) (πυκνότητας 1.112 g/ml) και με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της σφαιρικής HDL (πυκνότητας 1.112 g/ml), και δισκοειδή σωματίδια rHDL των μεταλλαγμένων μορφών αποA-I: Δ(185→243) και αποA-I: Δ(198→243). Οι τιμές που δίνονται αποτελούν τις μέσες τιμές μετρήσεων δειγμάτων εις διπλούν και αποτελούν % ποσοστό της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών (Το 100% της τιμής της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών είναι 372 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης).



257

ΕΙΚΟΝΑ 47

ΕΙΚΟΝΑ 48. Σύνδεση σωματιδίων rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή αποA-I: Δ(185→243) σε κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7, με χρήση της τεχνικής του ανοσο-υποδοχέα. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] και ldlA-7 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6-θέσεων σε θρεπτικό μέσο B και A αντίστοιχα, σε πυκνότητα $3*10^5$ κυττάρων ανά θέση. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις δισκοειδών σωματιδίων rHDL που περιέχουν την μεταλλαγμένη μορφή προαποA-I: Δ(185→243). Οι τιμές της ειδικής σύνδεσης για τα κύτταρα ldlA[mSR-BI] παριστάνονται με κλειστούς κύκλους (●) και για τα κύτταρα ldlA-7 παριστάνονται με ανοικτούς κύκλους (❍) και υπολογίσθηκαν με μη γραμική ανάλυση, όπως εξηγείται στην εικόνα 39. Οι τιμές εκφράζονται ως ng πρωτεΐνης αποA-I: Δ(185→243) συνδεδεμένης με τα κύτταρα ανά mg της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης και αποτελούν τον μέσο όρο μετρήσεων δειγμάτων εις διπλούν.



259

EIKONA 48

Οι τιμές της εικόνας 48 είναι αντιπροσωπευτικές δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά παρασκευάσματα δισκοειδών σωματιδίων rHDL{αποA-I: Δ(185→243)}. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η απαλοιφή ενός μεγάλου μέρους της καρβοξυτελικής περιοχής της αποA-I (αμινοξέα 185-243) δεν επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα της πρωτεΐνης, όταν είναι ενσωματώμενη σε δισκοειδή σωματίδια rHDL, να συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI.

Τέλος οι μορφές της αποA-I που περιέχουν τις καρβοξυτελικές αυτές μεταλλαγές, υπό ελεύθερη μορφή χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα συναγωνισμού για την σύνδεση ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI. Η εικόνα 49 φανερώνει ότι η HDL συναγωνίζεται για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε ποσοστό 28%. Η αποA-I του πλάσματος και ο φυσικός τύπος αποA-I συναγωνίζονται σε ποσοστό 63% και 69% αντίστοιχα, σε συγκέντρωση 50 μg/ml. Οι μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: Δ(185→243) και αποA-I: Δ(198→243) συναγωνίζονται για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε ποσοστά 78% και 80% αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά φανερώνουν ότι οι ελεύθερες λιπιδίων μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I στις οποίες έχουν απαλοιφεί καρβοξυτελικές περιοχές, αποA-I: Δ(185→243) και αποA-I: Δ(198→243), χαρακτηρίζονται από μειωμένη ικανότητα συναγωνισμού για την σύνδεση της ^{125}I-HDL σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI.

Στα πλαίσια της μελέτης της σύνδεσης μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI χρησιμοποιήθηκαν και η αμινοτελική μετάλλαξη αποA-I: Δ(1-59) και η διπλή μετάλλαξη αποA-I: Δ(1-59)(185-243). Βρέθηκε ότι τα σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I: Δ(1-59) συνδέονται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI και συναγωνίζονται ισχυρά για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI. Τα σωματίδια rHDL που περιέχουν την διπλή μετάλλαξη αποA-I: Δ(1-59)(185-243) συναγωνίζονται ασθενώς για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI και πιθανώς συνδέονται με μειωμένη συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μέγιστη σύνδεση των δισκοειδών σωματιδίων rHDL στον υποδοχέα SR-BI μπορεί να επιτευχθεί με την παρουσία της κεντρικής περιοχής του μορίου της αποA-I (αμινοξέα 60-184), σε συνδυασμό με είτε την καρβοξυτελική είτε την αμινοτελική περιοχή του μορίου. Η ταυτόχρονη απαλοιφή των 59 καρβοξυτελικών και 59 αμινοτελικών αμινοξέων της αποA-I μπορεί να προκαλεί αλλαγές στην διαμόρφωση της στα σωματίδια rHDL που καταλήγουν σε μειωμένη συγγένεια σύνδεσης. Επίσης είναι πιθανό ότι η καρβοξυτελική και η αμινοτελική περιοχή του μορίου της αποA-I μπορεί να συντελούν με ανεξάρτητο τρόπο στην σύνδεση της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI.

ΕΙΚΟΝΑ 49. Αναστολή της σύνδεσης σφαιρικής ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI από τις μεταλλαγμένες ελεύθερες λιπιδίων μορφές της αποA-I. Την ημέρα 0 κύτταρα ldlA[mSR-BI] τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων σε συγκέντρωση 4.5-5*10^4 κυττάρων ανά θέση, με θρεπτικό μέσο Β, όπως έχει περιγραφεί στις μεθόδους. Την ημέρα 2 τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1.5 ώρα, σε 37° C, με ^{125}I-HDL (3 μg πρωτεΐνης/ml, πυκνότητας 1.141 g/ml), παρουσία των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, σε συγκέντρωση 50 μg/ml. Οι τιμές που παριστάνονται αποτελούν τις μέσες τιμές μετρήσεων δειγμάτων εις διπλούν και αποτελούν % ποσοστό της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών (Το 100% της τιμής της κυτταρικής σύνδεσης της ^{125}I-HDL, απουσία συναγωνιστών είναι 211 ng πρωτεΐνης/mg κυτταρικής πρωτεΐνης).

Συναγωνιστής
αποA-I
A-I Δ(198-243)
A-I Δ(185-243)
Φυσικός τύπος A-I
A-I πλάσμιος
HDL

0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Κυτταρική ένωση 125 I- HDL
(% του κοντρόλ)
262

ΕΙΚΟΝΑ 49

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η μελέτη μιας πρωτεΐνης ξεκινά από τον καθορισμό της πρωτοταγούς της δομής. Η αλληλουχία των αμινοξέων που συνιστούν μια πρωτεΐνη δίνει πληροφορίες για την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της. Η πληροφορία αυτή μπορεί να συμβάλλει αλλά δεν είναι πλήρως επαρκής για την κατανόηση της τρισδιάστατης δομής της που είναι απαραίτητη για την διερεύνηση της λειτουργίας της. Τα τελευταία χρόνια έχει δωθεί μεγάλη έμφαση στην κατανόηση της σχέσης που υπάρχει μεταξύ της δομής και λειτουργίας πρωτεϊνών όπως η αποA-I που έχουν σημαντικό βιολογικό ρόλο (structure-function analysis).

Η παρούσα διατριβή εστιάσθηκε στην ανάλυση της δομής και της λειτουργίας της αποA-I. Σκοπός της διατριβής ήταν να κατανοηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο συγκεκριμένες λειτουργικές περιοχές (domains) και ίσως επιμέρους αμινοξέα της αποA-I συμβάλλουν στις φυσιολογικές της λειτουργίες και να μελετηθούν περιοχές της αποA-I οι οποίες συμβάλλουν στην σταθεροποίηση της δευτεροταγούς και της τριτοταγούς δομής της αποπρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα, όσο και στην κατάσταση που η αποA-I είναι συνδεδεμένη με λιπίδια. Έμφαση δόθηκε σε υποθετικές περιοχές της αποA-I που μπορεί να συμμετέχουν σε καλά καθιερωμένες λειτουργίες της. Οι λειτουργίες είναι η ικανότητα της αποA-I να συνδέεται με λιπίδια και να σχηματίζει σωματίδια λιποπρωτεϊνών, η ικανότητα της να δρά ως συμπαράγοντας του ενζύμου LCAT και ο ρόλος της στην σύνδεση του υποδοχέα SR-BI.

Για τον σκοπό αυτό, έγινε κατ'αρχήν μεταλλαξιγένεση του γονιδίου της αποA-I και μετά από επιμόλυνση και επιλογή, δημιουργήθηκαν κυτταρικές σειρές που εκφράζουν διαφορετικές μορφές της αποA-I. Οι πρωτεΐνες που παρήχθησαν καθαρίστηκαν από τα μέσα καλλιέργειας κυττάρων και χρησιμοποιήθηκαν σε μια ποικιλία λειτουργικών μελετών. Επίσης έγιναν φυσικοχημικές μελέτες της δευτεροταγούς δομής και της σταθερότητας των διαφόρων μορφών της αποA-I στην θέρμανση και σε αποδιατακτικές ουσίες για να εκτιμηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων στην δομή της αποA-I.

<u>Μεταλλαξιγένεση της αποA-I</u>

Στην παρούσα διατριβή έγιναν συνολικά 9 μεταλλάξεις στο γονίδιο της αποA-I, οι οποίες είναι οι εξής:

10) Εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στην θέση 165 του αμινοξέος προλίνη (απαλοιφή των ελίκων 7-10),

11) Εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στην θέση 175 του αμινοξέος αλανίνη (απαλοιφή μέρους της έλικας 7 και των ελίκων 8-10),
12) Εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στην θέση 185 του αμινοξέος γλυκίνη (απαλοιφή των ελίκων 8-10),
13) Εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στην θέση 198 του γλουταμικού οξέος (απαλοιφή μέρους της έλικας 8 και των ελίκων 9-10),
14) Εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στην θέση 220 του αμινοξέος προλίνη (απαλοιφή της περιοχής τυχαίου σπειράματος μεταξύ των ελίκων 9 και 10 και της έλικας 10)
15) Εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού στην θέση 232 του αμινοξέος αλανίνη (απαλοιφή μέρους της έλικας 10)
16) Αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη στις θέσεις 185 και 186 της έλικας 7 από προλίνες
17) Απαλοιφή των αμινοξέων 187-197 (μέρους της έλικας 8)
18) Απαλοιφή των αμινοξέων 165-175 (μέρους της έλικας 7)

ΛΟΓΙΚΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Ο σχεδιασμός των μεταλλάξεων της αποΑ-Ι βασίστηκε στα ακόλουθα δεδομένα:

1) Σημασία συγκεκριμένων περιοχών της αποΑ-Ι για την σύνδεση με λιπίδια, τον σχηματισμό σωματιδίων λιποπρωτεϊνών και τον σχηματισμό ολιγομερών

Η δευτεροταγής δομή της αποΑ-Ι (Εικόνα 8) χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμφιπαθικών α-ελίκων, οι οποίες έχουν την ικανότητα σύνδεσης σε λιπίδια. Προηγούμενες μελέτες (165) έχουν δείξει ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποΑ-Ι συμμετέχει στην σύνδεση της πρωτεΐνης με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων. Επίσης, η απουσία μονοκλωνικών αντισωμάτων για το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή μπορεί να είναι κρυμμένη μέσα στην λιπιδική διπλοστοιβάδα της HDL (374).

Οι μεταλλαγμένες μορφές που σχεδιάστηκαν επέτρεψαν την λεπτομερή μελέτη του ρόλου της καρβοξυτελικής περιοχής της αποΑ-Ι στην σύνδεση με λιπίδια, τον σχηματισμό σωματιδίων λιποπρωτεϊνών και τον σχηματισμό ολιγομερών.

2) Σημασία συγκεκριμένων περιοχών της αποΑ-Ι για την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT

Έχει προταθεί από τους Segrest et al (161) ότι η κύρια περιοχή της αποΑ-Ι που

ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT σχετίζεται με τις δύο α-έλικες που περιέχουν γλουταμικό οξύ και βρίσκονται στην περιοχή των αμινοξέων 66-121. Επίσης έχει δειχθεί ότι η κεντρική περιοχή της αποA-I (έλικες 6-7) μεταξύ των αμινοξεων 145-186 παίζει σημαντικό ρόλο για την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT (164, 165), και ότι η απαλοιφή των ελίκων 6 και 7 αναστέλλει πλήρως την ικανότητα της πρωτεΐνης να ενεργοποιήσει το ένζυμο LCAT (166).

Με βάση τα παραπάνω στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος της καρβοξυτελικής περιοχής της αποA-I στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις ανεμένετο να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων περιοχών της αποA-I που είναι απαραίτητες για την απ'ευθείας ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Υπήρχε επίσης το ενδεχόμενο οι αλλαγές στην ικανότητα της πρωτεΐνης να ενεργοποιήσει το ένζυμο LCAT να ενεργήσουν αλλάζοντας τον προσανατολισμό και την διαμόρφωση της κεντρικής περιοχής ή του μορίου της αποA-I.

3) Η πιθανή συμμετοχή της κεντρικής περιοχής της αποA-I στο σχηματισμό δεματιού α-ελίκων σε διάλυμα, και στην σταθεροποίηση της πρωτεΐνης

Το μοντέλο για την δευτεροταγή δομή της αποA-I που προβλέπεται από ανάλυση αλληλουχίας, δείχνει την παρουσία περιοχών που πιθανόν να έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αντιπαράλληλο δεμάτι ελίκων σε διάλυμα, παρόμοιο με αυτό που έχει προβλεφθεί για την αποE (64) και την λιποφορίνη III (65). Στην απλούστερη περίπτωση, δεμάτια α-ελίκων σχηματίζονται από 4 αντιπαράλληλες α- έλικες που διασταυρώνονται σε γωνία περίπου 20 μοιρών.

Ο σχεδιασμός ορισμένων μεταλλάξεων με βάση το μοντέλο της δευτεροταγούς δομής της αποA-I (Εικόνα 8) έγινε με σκοπό την μελέτη της ύπαρξης της δομής του δεματιού των 4-α-ελίκων (μεταξύ των ελίκων 4-7). Τέτοιες μεταλλάξεις αφορούν οι μορφές στις οποίες απαλοίφονται τα αμινοξέα 165-243, 175-243, καθώς και η μορφή όπου αντικαθίστανται οι γλυκίνες στις θέσεις 185 και 186, μεταξύ των ελίκων 7 και 8, από προλίνες. Η πρόβλεψη ήταν ότι οι μεταλλάξεις αυτές θα αποσταθεροποιούσαν την δομή του δεματιού των α-ελίκων και πιθανόν να είχαν σημαντικές επιδράσεις στις λειτουργίες της αποA-I, όπως την ικανότητα σύνδεσης με λιπίδια ή την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT.

4) Αναγνώριση της αποA-I και σωματιδίων λιποπρωτεϊνών από τον υποδοχέα της HDL, SR-BI.

Ο πρόσφατος χαρακτηρισμός του υποδοχέα SR-BI έδειξε ότι αναγνωρίζει την HDL και ότι η αποA-I είναι μία από τις πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI (21).

Στην παρούσα διατριβή σχεδιάστηκαν μεταλλάξεις για τον εντοπισμό των περιοχών της αποA-I που πιθανόν συμβάλλουν στην σύνδεση της στον υποδοχέα. Ταυτόχρονα έγινε πιο λεπτομερής μελέτη της σύνδεσης της λιποπρωτεΐνης HDL στον υποδοχέα SR-BI.

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΓΡΑΜΜΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-Ι ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥΣ

Η μεταλλαξιγένεση του γονιδίου της αποA-I έγινε στον φορέα pUC19AI (NotI, XhoI), με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), και κατάλληλα σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές. Για την έκφραση των μεταλλαγμένων γονιδίων της αποA-I έγινε υποκλωνοποίηση τους στον φορέα PBMT3XA-I, ο οποίος βασίζεται στο γονιδίωμα του ϊού βοΐου θηλώματος. Η χρήση του φορέα έκφρασης που βασίζεται στον ϊό βοΐου θηλώματος σε συνδυασμό με την κυτταρική σειρά C127 του ποντικού (που προέρχεται από όγκο μαστικού αδένα του ποντικού) μπόρεσε να δώσει αρκετές ποσότητες της πρωτεΐνης αποA-I, για τη χρήση τους σε λειτουργικές και δομικές μελέτες. Το πλεονέκτημα της κυτταρικής σειράς C127 είναι ότι δεν παράγει καμμιά ενδογενή απολιποπρωτεΐνη.

Μετά από επιμόλυνση και επιλογή δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I. Στη συνέχεια οι σταθερές κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε μεγάλη κλίμακα, με την τεχνολογία των περιστρεφόμενων κυλινδρικών φιαλών, οι οποίες περιέχουν μικροσφαιρίδια που επικαλύπτονται από κολλαγόνο. Το κυτταρικό μέσο καλλιέργειας απομονώθηκε όπως περιγράφεται στις μεθόδους και χρησιμοποιήθηκε ως πηγή για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης αποA-I.

Η τεχνολογία των περιστρεφόμενων κυλινδρικών φιαλών επιτρέπει την ταυτόχρονη καλλιέργεια κυτταρικών σειρών που εκφράζουν διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης αποA-I, και η χρήση του συστήματος αυτού είναι εύκολη σε σχέση

με άλλα διαθέσιμα συστήματα καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα. Ένα άλλο πλεονέκτημα του συστήματος των κυλινδρικών φιαλών είναι ότι μας επιτρέπει να μεγαλώνουμε την ίδια κυτταρική σειρά για εκτεταμένη χρονική περίοδο, μέχρι η κυτταρική σειρά να φθάσει στο στάδιο της γήρανσης, μετά από 1-6 μήνες καλλιέργειας. Επιπλέον η δυνατότητα αντικατάστασης των μικροσφαιριδίων κατά την διάρκεια ανάπτυξης της καλλιέργειας, επιτρέπει στα κύτταρα να προσκολλώνται στα νεοπροστιθέμενα μικροσφαιρίδια και να αναπτύσσονται για περιόδους που κυμαίνονται από 1-6 μήνες.

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I έγινε με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, μια τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο και το μέγεθός τους. Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι τα κύτταρα C127 εκκρίνουν τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ως προ-αποA-I μορφές, που έχουν μέγεθος και φορτίο συμβατό με τις μεταλλάξεις. Οι παρούσες μελέτες είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (95, 165) και φανερώνουν ότι η παρουσία του προπεπτιδίου των 6 αμινοξέων δεν επηρέασε τις βιολογικές λειτουργίες της αποA-I, όπως αναλύεται περαιτέρω.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΑ-Ι

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκαν απλές μεθοδολογίες για τον καθαρισμό των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών από το κυτταρικό μέσο καλλιέργειας και την χρήση τους για την μελέτη των λειτουργιών της αποA-I. Δύο από τις μεταλλαγμένες μορφές που δεν εκκρίνουν ικανοποιητικά ποσά αποA-I χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα κινητικής της έκκρισης τους, για να μελετηθεί η αιτία της μειωμένης έκκρισης της αποA-I. Τέλος μερικές από τις πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε συνεργασία με την Δρ. Gorchova για φυσικοχημικές μελέτες προσδιορισμού δευτεροταγούς δομής και σταθερότητας της αποA-I (375).

1) Χαρακτηριστικά της σύνδεσης των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με λιπίδια και το σχηματισμό σωματιδίων λιποπρωτεΐνης

Τα πειράματα της σύνδεσης με φωσφολιπίδια έγιναν με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων στην κινητική της αλληλεπίδρασης της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι πιθανό να ακολουθεί παρόμοιο μηχανισμό με την σύνδεση της αποA-I με φωσφολιπίδια των

μεμβρανών ή των λιποπρωτεϊνών που οδηγεί στο σχηματισμό δισκοειδών σωματιδίων της HDL, όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (95).

Η ανάλυση των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I έδειξε ότι η απαλοιφή της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης (αμινοξέα 185-231) έχει δραματική επίδραση στην κινητική αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών με τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC. Η μεταλλαγμένη μορφή που φέρει την απαλοιφή μόνο των 10 τελευταίων αμινοξέων της πρωτεΐνης (αποA-I: Δ(232→243)) δεν επηρέασε σημαντικά την κινητική της αλληλεπίδρασης της αποA-I με τα πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου, συγκριτικά με τις άλλες μεταλλαγμένες μορφές που φέρουν τις μεγαλύτερες απαλοιφές. Η μορφή της αποA-I που περιέχει την απαλοιφή μέρους της έλικας 8 του καρβοξυτελικού τμήματος της αποA-I (αμινοξέα 187-197) εμφανίζει βελτιωμένη κινητική αλληλεπίδρασης με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC, αλλά και πάλι σε σχέση με τον φυσικό τύπο της αποA-I, η κινητική της αλληλεπίδρασης είναι πολύ πιο αργή. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απαλοιφή των 10 αμινοξέων της κεντρικής έλικας 7 της αποA-I (αμινοξέα 165-175) φαίνεται να έχει δραματική επίδραση στην κινητική της αλληλεπίδρασης της μεταλλαγμένης μορφής της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με μελέτες που δημοσιεύτηκαν κατά την διάρκεια της παρούσης διατριβής: Μελέτες με συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν σε διάφορες έλικες της αποA-I έδειξαν ότι πεπτίδια που αντιστοιχούν στις έλικες 9,10 (Εικόνα 8) έχουν την μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με λιπίδια (91, 92). Επίσης οι Rogers et al (93) έδειξαν με μελέτη μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, ότι η έλικα 10 (αμινοξέα 233-243) είναι απαραίτητη για την σύνδεση της αποA-I με φωσφολιπίδια (POPC και DMPC), ενώ άλλες μελέτες έδειξαν ότι η αρχική ταχύτητα σύνδεσης της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC μειώνεται, όταν απαλοιφούν οι κεντρικές έλικες 5-7 της αποA-I (94). Τέλος καρβοξυτελικές απαλοιφές της αποA-I (95) έδειξαν μειωμένη σύνδεση με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC και ελαττωματική σύνδεση της αποA-I με την HDL. Οι Laccotrippe et al (95) επίσης με μελέτες σημειακής μεταλλαξιγένεσης έδειξαν ότι η αντικατάσταση συγκεκριμένων αμινοξέων στην περιοχή 211 μέχρι 229 της αποA-I, τροποποιεί πλήρως την κινητική της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I με πολυμεμβρανικά λιποσώματα φωσφολιπιδίων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι συμβατά με τις προηγούμενες θεωρείες (68, 71, 95, 169), οι οποίες προτείνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-

I, λόγω της αλληλεπίδρασης με λιπίδια, είναι πιθανόν ότι συμμετέχει στην αρχική εισχώρηση της πρωτεΐνης στην διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων των σωματιδίων της HDL, και με τον τρόπο αυτό η πρωτεΐνη δεσμεύεται κατ'αρχήν στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο. Μετά την αρχική σύνδεση το υπόλοιπο μόριο μπορεί να τυλιχθεί γύρω από το σωματίδιο της HDL κατά τρόπο που οι μη πολικές επιφάνειες των α-ελίκων να προσανατολίζονται στο εσωτερικό προς την πλευρά των υδροφόβων αλυσίδων των φωσφολιπιδίων ενώ οι πολικές επιφάνειες να προσανατολίζονται προς το εξωτερικό υδατικό περιβάλλον.

Παρά το γεγονός ότι η πλειονότητα των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I αλληλεπιδρά με πολύ αργή ταχύτητα με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του φωσφολιπιδίου DMPC, η χρήση της μεθόδου διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου επιτρέπει την αποτελεσματική αλληλεπίδραση των μορφών αυτών με λιπίδια (POPC και χοληστερόλη) για τον σχηματισμό σωματιδίων ανασυγκροτημένης HDL (rHDL). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (95, 169).

2) Ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I

Για να μελετηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I στην ικανότητα των αντιστοίχων πρωτεϊνών να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ανασυγκροτήθηκαν σε σωματίδια rHDL με χρήση της μέθοδου διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου. Αυτά τα σωματίδια έχει δειχθεί από πριν ότι αποτελούν πολύ καλά υποστρώματα για την αντίδραση εστεροποίησης της χοληστερόλης από το ένζυμο LCAT (167). Το μέγεθος των σωματιδίων χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση υπό φυσικές συνθήκες σε πήκτωμα διαβάθμισης πολυακρυλαμιδίου, και η παρουσία τους πιστοποιήθηκε με φωτογράφηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I έδειξαν την παρουσία τριών πληθυσμών σωματιδίων, με μεγέθη 120-122 Å, 96-104 Å και 78-80 Å, και οι διαφορές στα μεγέθη εξαρτώνται από την φύση των μεταλλάξεων. Τα πειράματα ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT έγιναν με τον μεικτό πληθυσμό των σωματιδίων. Τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν ως ποσοστό % της ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT από τις μεταλλαγμένες μορφές σε σχέση με τον φυσικό τύπο της αποA-I. Οι σχετικές αλλαγές στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT πιθανόν να αντιπροσωπεύουν τις διαφορές στην δομή της αποA-I που προκαλείται από την μετάλλαξη. Επίσης η ενεργοποίηση του LCAT εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά των δισκοειδών σωματιδίων που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές

της αποA-I. Το μέγεθος των σωματιδίων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την σύγκρισή τους με άλλες εργασίες.

Η αποA-I του πλάσματος και ο ανασυνδυασμένος φυσικός τύπος της αποA-I σχηματίζουν σωματίδια rHDL με μεγέθη περίπου 120 Å και 96 Å. Τα ίδια μεγέθη σωματιδίων rHDL δίνουν και οι μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: (G185, G186→P185, P186), αποA-I: Δ (165→175) και αποA-I: Δ (187→197).

α) Η μετάλλαξη στην οποία οι γλυκίνες στις θέσεις 185 και 186 αντικαταστάθηκαν από προλίνες οδηγεί σε λιγότερη ενεργοποίηση σε σχέση με τον φυσικό τύπο σε ποσοστό 63%. Η μετάλλαξη αυτή σχεδιάστηκε με σκοπό την μελέτη της επίδρασης προλινών (που διακόπτουν τις δομές των α-ελίκων) στην σταθερότητα της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα. Η μετάλλαξη αυτή είχε προβλεφθεί με βάση το μοντέλο του Nolte και Atkinson (Εικόνα 8) ότι μπορεί να επηρεάσει τον προσανατολισμό των καρβοξυτελικών ελίκων 7 και 8, με αποτέλεσμα να μειώσει την ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να ενεργοποιήσει το ένζυμο LCAT.

β) Η πρωτεΐνη που περιέχει την απαλοιφή των αμινοξέων 165-175 της έλικας 7 προκαλεί μικρότερη ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT (ποσοστό 61% σε σχέση με τον φυσικό τύπο). Η μειωμένη ενεργοποίηση είναι συμβατή με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έδειξαν την σημασία της κεντρικής περιοχής της αποA-I (αμινοξέα 145-187) στην ενεργοποίηση του LCAT (164, 165, 166).

γ) Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που φέρει την απαλοιφή των 10 αμινοξέων της έλικας 8 (187-197) προκαλεί ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT σε ποσοστό 43% σε σχέση με τον φυσικό τύπο της αποA-I. Η μειωμένη ενεργοποίηση επίσης μπορεί να οφείλεται στην αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης της πρωτεΐνης, η οποία πιθανώς να επηρεάζει τον τρόπο αλληλεπίδρασης της αποA-I με το ενεργό κέντρο του LCAT.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες που δημοσιεύτηκαν κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής και οι οποίες έδειξαν ότι η κεντρική περιοχή της αποA-I (αμινοξέα 148-185) είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Οι παλαιότερες μελέτες για τον ρόλο περιοχών της αποA-I στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT περιλάμβαναν χρήση συνθετικών πεπτιδίων (168), χρήση μεταλλαγμένων μορφών απο-AI με σημειακές μεταλλάξεις (165) και χρήση μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I, όπου έχουν απαλοιφεί οι κεντρικές έλικες της πρωτεΐνης (166). Η φυσική μεταλλαγή P165-R έχει 45-55% μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του LCAT (221). Επίσης η μετάλλαξη της αποA-I (P165-Ala, Gln172-Glu) μειώνει την ενεργοποίηση του LCAT κατά 45% (95). Ο προσανατολισμός των κεντρικών ελίκων είναι σημαντικός για την

ενεργοποίηση του LCAT, δεδομένου ότι η αντικατάσταση των ελίκων 6 και 7 από καρβοξυτελικές έλικες (170), ή η αλλαγή του προσανατολισμού-υδροφοβικότητας της έλικας 6 (171) επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I να ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT.

Είναι πιθανόν οι αλλαγές που προκαλούνται στην στερεοδιαμόρφωση της αποA-I, λόγω των μεταλλάξεων να αποσταθεροποιούν πιθανές ιονικές ή υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κεντρικών ελίκων, να αλλάζουν τον προσανατολισμό των ελίκων και επίσης να τροποποιούν την στερεοειδική αλληλεπίδραση μεταξύ της αποA-I και του ενεργού κέντρου του ενζύμου LCAT, με αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης της LCAT.

δ) Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τις υπόλοιπες μεταλλάξεις είναι τα εξής: οι μεταλλαγμένες μορφές αποA-I: Δ (185→243), αποA-I: Δ (198→243), αποA-I: Δ (220→243) και αποA-I: Δ (232→243), ενεργοποιούν το LCAT σε ποσοστά 49, 39, 37 και 34% σε σχέση με τον φυσικό τύπο της αποA-I αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με προηγούμενες μελέτες (165, 166) όπου η απαλοιφή των αμινοξέων 209-219, 220-241, 212-233, 213-243 οδήγησε σε ενεργοποίηση της LCAT κατά 11.2, 16, 28, και 13% αντίστοιχα σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I. Επίσης συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν στα αμινοξέα 200-243 της αποA-I ενεργοποιούν σε πολύ μικρό βαθμό το LCAT (168). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η ταυτόχρονη αντικατάσταση των αμινοξέων 211,214,218 καθώς επίσης και η αντικατάσταση των αμινοξέων 222, 225, 229 στην καρβοξυτελική περιοχή μειώνει την ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών να ενεργοποιούν το LCAT σε ποσοστά 68% και 38% σε σύγκριση με τον φυσικό τύπο της αποA-I αντίστοιχα (95). Γενικώς υπάρχουν διαφορές στα ποσοστά ενεργοποίησης του ενζύμου LCAT σε διάφορες μελέτες. Οι διαφορές αυτές μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της διαφορετικής σύστασης των rHDL σωματιδίων σε φωσφολιπίδια, ή διαφορές στο μέγεθος των rHDL σωματιδίων που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μελέτες.

Τα συνολικά δεδομένα αυτής και προηγουμένων μελέτων δείχνουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Είναι πιθανό ότι η παρουσία του καρβοξυτελικού μέρους είναι απαραίτητη για να αποκτήσει η αποA-I την κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση που διευκολύνει την ειδική αλληλεπίδραση των κεντρικών ελίκων (6 και 7) της αποA-I με τις δύο α-έλικες (αμινοξέα 116-129 και 387-398) του ενζύμου LCAT (159, 160).

3) Ικανότητα των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I να σχηματίζουν ολιγομερή

Οι μελέτες σύνδεσης με λιπίδια και λιποπρωτεΐνες υποδεικνύουν ότι η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I συμμετέχει στην αρχική εισχώρηση της πρωτεΐνης στην φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα. Επίσης σύμφωνα με τον μοντέλο ζώνης, που περιγράφει την διευθέτηση των ελίκων της αποA-I σε δισκοειδή σωματίδια rHDL, η καρβοξυτελική έλικα της αποA-I είναι σημαντική για τον σχηματισμό του διμερούς που προσδένεται στην περιφέρεια του rHDL (70, 74). Προηγούμενες μελέτες (95, 169) έδειξαν ότι καρβοξυτελικά μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I μπορούν να σχηματίσουν διμερή, αλλά όχι ολιγομερή υψηλών τάξεων, και πρότειναν ότι σε υδατικό διάλυμα η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I συμμετέχει στο σχηματισμό ολιγομερών.

Στην διατριβή αυτή φαίνεται ότι όλες οι μορφές της αποA-I που φέρουν τις μικρότερες ή μεγαλύτερες απαλοιφές στην καρβοξυτελική περιοχή, περιλαμβανομένων και των απαλοιφών των αμινοξέων 187-197 και 165-175, υπό μορφή ελεύθερων λιπιδίων, διατηρούν την ικανότητα σχηματισμού διμερών, αλλά πολύ μικροτέρων ποσών τριμερών και τετραμερών, σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I. Αντιθέτως η σημειακή μετάλλαξη στην οποία αντικαθίστανται τα αμινοξέα γλυκίνη στις θέσεις 185 και 186 από προλίνες δεν επηρεάζει την ικανότητα της μεταλλαγμένης μορφής να σχηματίσει διμερή και ολιγομερή με παρόμοιο τρόπο με τον φυσικό τύπο της αποA-I.

Στο παρελθόν ο σχηματισμός ολιγομερών (aggregates) της αποA-I έχει αποτελέσει βασικό πρόβλημα στην προσπάθεια κρυστάλλωσής της. Η κρυστάλλωση και ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της αποA-I έγινε με την απαλοιφή του αμινοτερματικού της τμήματος 1-43 (70).

4) Περιοχές της αποA-I που είναι σημαντικές για την έκκριση και την σταθερότητα της πρωτεΐνης

Οι μελέτες αυτές βασίστηκαν στην κινητική της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών, που φέρουν τις καρβοξυτελικές απαλοιφές των αμινοξέων 165-243 και 175-243. Οι πρωτεΐνες αυτές, παρόλο που μπόρεσε να ταυτοποιηθεί η παρουσία τους στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, δεν μπόρεσαν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες για τις δομικές και τις λειτουργικές μελέτες. Αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι υπάρχει πρόβλημα στην έκκριση και την σταθερότητά τους.

Έγιναν πειράματα ραδιοσήμανσης και απομάκρυνσης του ραδιενεργού αμινοξέος (pulse-chase). Η ανάλυση αυτή φανερώνει, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (368)

ότι ο χρόνος ημίσσειας ζωής ($t_{1/2}$) της ενδοκυττάριας μορφής του φυσικού τύπου της αποA-I είναι περίπου 19.5 λεπτά. Επίσης η ανάλυση έδειξε ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) της ενδοκυττάριας μορφής της αποA-I είναι περίπου 40 λεπτά για την αποA-I: Δ(165→243) και 45 λεπτά για την αποA-I: Δ(175→243). Ο χρόνος ημίσσειας ζωής για τις μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I είναι περίπου διπλάσιος αυτού της αποA-I του φυσικού τύπου. Η παρατηρούμενη επιβράδυνση στην κινητική έκκρισης των αποA-I: Δ(165→243) και αποA-I: Δ(175→243) υποδηλώνει ότι οι απαλοιφές των καρβοξυτερματικών άκρων 165-243 ή 175-243 πιθανόν να αποσταθεροποιούν την αποA-I μέσα στο κύτταρα και να επιβραδύνουν την έκκρισή της.

Πιο συστηματικές μελέτες απαιτούνται για να καθοριστεί αν η αποA-I που εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας έχει υποστεί ενδοκυττάρια αποικοδόμηση.

5) Φυσικοχημικές μελέτες των μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I

Στα πλαίσια της διατριβής αυτής χρησιμοποιήθηκαν κάποιες μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, σε φυσικοχημικές μελέτες, με σκοπό την μελέτη της δευτεροταγούς δομής της καρβοξυτελικής περιοχής της αποA-I, υπό την μορφή αποπρωτεϊνών (σε διάλυμα), καθώς και την συμμετοχή τους στην σταθερότητα της πρωτεΐνης. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε συνεργασία με την Δρ. Irina Gorshkova, και περιλαμβάνουν κυκλικό διχροϊσμό, φασματοσκοπία φθορισμού και αποδιάταξη με θέρμανση και με χημικές ουσίες (GnCl και ουρία).

Η αντικατάσταση των γλυκινών στις θέσεις 185 και 186 από προλίνες έγινε με σκοπό να διερευνηθεί αν τα υπολλείμματα στις θέσεις αυτές βρίσκονται σε περιοχή που έχει δομή έλικας, ή δομή θηλιάς με λιγότερη οργάνωση (loop-disordered region). Η προσθήκη προλίνης μεταξύ α-ελίκων είναι γνωστό ότι διαταράσσει και αποσταθεροποιεί την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε ότι στην αποA-I ελεύθερη λιπιδίων σε διάλυμα, η μετάλλαξη αυτή δεν αλλάζει το ποσοστό α-έλικας της πρωτεΐνης, και οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς στην περιοχή αυτή της αποA-I υπάρχει μια δομή που μοιάζει με θηλειά (loop-disordered). Η παρατήρηση αυτή είναι σε μερική συμφωνία με τις λειτουργικές μελέτες σύνδεσης σε λιπίδια, όπου η μετάλλαξη αυτή δεν επηρεάζει την ικανότητα της πρωτεΐνης να ενωθεί με πολυμεμβρανικά λιποσώματα του DMPC. Επίσης η μειωμένη ικανότητα αυτής της μεταλλαγμένης μορφής να ενεργοποιήσει το ένζυμο LCAT πιθανώς να είναι αποτέλεσμα αλλαγών στη στερεοδομή της πρωτεΐνης στα σωματίδια rHDL.

Η απαλοιφή του καρβοξυτελικού τμήματος (185-243) δεν επηρέασε την δευτεροταγή δομή και την σταθερότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, απουσία λιπιδίων, σε συμφωνία με άλλες πρόσφατες φυσικοχημικές μελέτες (67, 93, 169). Αντίθετα η απαλοιφή μιας μικρότερης αλληλουχίας (198-243) προκάλεσε μείωση κατά 11% του ποσοστού α-έλικας, η οποία συνοδεύεται από μείωση στην σταθερότητα της πρωτεΐνης. Η απαλοιφή των αμινοξέων 187-197 δεν μετέβαλε την σταθερότητα και το ποσοστό α-έλικας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Αντίθετα η απαλοιφή των αμινοξέων 165-175 μείωσε σημαντικά την σταθερότητα της πρωτεΐνης και μετέβαλε την στερεοδομή της (μείωση του ποσοστού α-έλικας κατά 20%). Είναι πιθανόν η παρουσία των αμινοξέων αυτών να είναι σημαντική για την σωστή αναδίπλωση (folding) της πρωτεΐνης. Προηγούμενες μελέτες επίσης έδειξαν ότι η απαλοιφή των αμινοξέων 88-98 μεταβάλλει σημαντικά το ποσοστό α-έλικας και την σταθερότητα της αποA-I. Γενικώς οι φυσικοχημικές μελέτες υποδηλώνουν την παρουσία μιας σταθερής δομής έλικας στο καρβοξυτελικό τμήμα της αποA-I και είναι σε συμφωνία με το μοντέλο των Nolte και Atkinson (61). Η καρβοξυτελική περιοχή της αποA-I είναι απαραίτητη για την σύνδεση σε φωσφολιπίδια και πιθανόν την έξοδο της ενδοκυττάριας χοληστερόλης καθώς και άλλες σημαντικές λειτουργίες της αποA-I.

6) Σύνδεση της αποA-I και της HDL με τον υποδοχέα SR-BI

Ένα σημαντικό τμήμα της διατριβής εστιάστηκε στην μελέτη της σύνδεσης της αποA-I και της HDL, με τον υποδοχέα SR-BI. Όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στην εισαγωγή, ο υποδοχέας SR-BI (ο οποίος απομονώθηκε από το εργαστήριο του Δρα. Monty Krieger) αποτελεί σημαντικό φυσιολογικό υποδοχέα της HDL. Στα πλαίσια της λεπτομερούς μελέτης της σύνδεσης της HDL και της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI εστιάστηκα στα ακόλουθα ερωτήματα:

α) Ανάπτυξη καινούριας τεχνικής σύνδεσης υποστρωμάτων που περιέχουν αποA-I στον υποδοχέα SR-BI (τεχνική ανοσο-υποδοχέα)

β) Σύγκριση της συγγένειας της ελεύθερης αποA-I και των δισκοειδών σωματιδίων rHDL που περιέχουν αποA-I για τον υποδοχέα SR-BI

γ) Επίδραση της πυκνότητας της HDL, που εξαρτάται από την σύσταση σε λιπίδια και απολιποπρωτεΐνες στην συγγένεια σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI

δ) Επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I στην σύνδεση με τον υποδοχέα SR-BI

α) Ανάπτυξη καινούριας τεχνικής σύνδεσης υποστρωμάτων που περιέχουν αποA-I στον υποδοχέα SR-BI (τεχνική ανοσο-υποδοχέα)

Το τυπικό πείραμα σύνδεσης μιας λιποπρωτεΐνης στον υποδοχέα της περιλαμβάνει την ραδιοσήμανση των απολιποπρωτεϊνών της λιποπρωτεΐνης (συνήθως γίνεται με ^{125}I-ιωδίωση) και την μέτρηση της σύνδεσης των λιποπρωτεϊνών με κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα (τεχνική ραδιο-υποδοχέα). Η χρήση της τεχνικής αυτής στην ανάλυση της σύνδεσης της HDL στον υποδοχέα SR-BI έδειξε ότι η ηλικία του ραδιοσημασμένου παρασκευάσματος της HDL μπορεί να επηρεάζει τις τιμές των παραμέτρων σύνδεσης (σταθερά διάστασης, Kd_{app}, και μέγιστης τιμής σύνδεσης σε κατάσταση κορεσμού, $Bmax_{app}$). Η μέθοδος του ανοσο-υποδοχέα δίνει αξιόπιστα και αναπαραγώμενα αποτελέσματα, όταν χρησιμοποιούνται πρόσφατα ραδιοσημασμένα παρασκευάσματα HDL. Επιπλέον η ραδιοσήμανση με ^{125}I είναι πιθανό να επηρεάζει τις ιδιότητες της λιποπρωτεΐνης, είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο, για παράδειγμα, ως αποτέλεσμα οξείδωσης. Οι παραπάνω λόγοι κατέστησαν αναγκαία την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για την εκτίμηση της πρόσδεσης πρωτεϊνών-συνδετών στον υποδοχέα SR-BI. Η νέα μέθοδος καλείται τεχνική ανοσο-υποδοχέα. Με την μέθοδο αυτή το σύμπλοκο του υποδοχέα-δεσμευτή που δεν είναι ραδιοσημασμένο ανιχνεύεται με ποσοτική ανοσο-αποτύπωση. Το πείραμα δεν επηρεάζεται από πιθανές αλλαγές-τροποποιήσεις στα χαρακτηριστικά του συνδέτη. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να γίνουν π.χ. σαν αποτελέσμα της ραδιοσήμανσης στην κλασική μέθοδο του ραδιο-υποδοχέα. Επίσης η νέα τεχνική αποτελεί ένα πολύ ευκολότερο και ταυτόχρονα αρκετά αποτελεσματικό εναλλακτικό τρόπο, για την μελέτη της σύνδεσης δεσμευτών που είναι διαθέσιμοι σε μικρές ποσότητες, και υπάρχουν πρακτικές δυσκολίες για την ιωδίωση τους (όπως π.χ. η ύπαρξη μικρών ποσοτήτων των ανασυνδυασμένων μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I).

Το πρώτο στάδιο στην εκτίμηση της νέας μεθόδου αποτέλεσε η συγκριτική μελέτη της σύνδεσης της HDL στον υποδοχέα SR-BI. Έτσι η χρησιμοποίηση της κλασσικής μεθόδου ραδιο-υποδοχέα και της νέας μεθόδου ανοσο-υποδοχέα έδειξε ότι η σφαιρική HDL (πυκνότητας d=1.1-1.13 g/ml) συνδέεται σε μια τάξη θέσεων στον υποδοχέα SR-BI με φαινομενική σταθερά διάστασης (Kd_{app}) περίπου 16-17 μg πρωτεΐνης/ml, και φαινομενικό $Bmax_{app}$ που κυμαίνεται μεταξύ 370-450 ng πρωτεΐνης ανά mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι διαφορές στις τιμές της μέγιστης τιμής σύνδεσης σε διάφορα πειράματα πιθανώς οφείλονται στην διαφορετική έκφραση του υποδοχέα SR-BI στα διαφορετικά πειράματα.

β) Σύγκριση της συγγένειας της ελεύθερης αποA-I και των δισκοειδών σωματιδίων rHDL που περιέχουν αποA-I για τον υποδοχέα SR-BI

Μια προηγούμενη μελέτη είχε δείξει ότι οι κύριες απολιποπρωτεΐνες της HDL, αποA-I, αποA-II, αποC-III, υπό την μορφή δισκοειδών σωματιδίων rHDL, μπορούν να συνδεθούν με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI και βάσει αυτών των παρατηρήσεων είχε προταθεί ότι η σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI επιτελείται μέσω των απολιποπρωτεϊνών της (21). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε εκτενέστερα ο ρόλος των λιπιδίων που συμπλέκονται με την αποA-I σε σωματίδια λιποπρωτεϊνών, για την σύνδεση της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI. Χρησιμοποιήθηκε αποA-I που έχει απομονωθεί από το πλάσμα, σε μορφή ελεύθερη λιπιδίων καθώς και δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποA-I}, που παρασκευάσθηκαν με την μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου. Τα σωματίδια είχαν διαμέτρους 96-104 Å και 120 Å.

Η αρχική ένδειξη ότι η παρουσία των λιπιδίων στην αποA-I επιδρά στην σύνδεση της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI προήλθε από πειράματα συναγωνισμού όπου φαίνεται ότι τα δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποA-I} αποτελούν πολύ καλούς συναγωνιστές για την σύνδεση ^{125}I-HDL στον SR-BI, ενώ η ελεύθερη λιπιδίων αποA-I δεν αποτελεί καλό συναγωνιστή (συναγωνίζεται μόνο μέχρι σε ποσοστό 55-60% στην σύνδεση της HDL). Ο μερικός συναγωνισμός που παρατηρήσαμε συμφωνεί με την μελέτη που είχε δημοσιευτεί προηγουμένως (21), στην οποία η ελεύθερη αποA-I συναγωνίζεται ασθενώς σε σχέση με τις ελεύθερες απολιποπρωτεΐνες αποA-II και αποC-III. Για την καλύτερη διευρεύνηση της συμπεριφοράς της αποA-I έγιναν πειράματα άμεσης σύνδεσης.

Χρησιμοποιώντας και τις δύο τεχνικές (ραδιο-υποδοχέα και ανοσο-υποδοχέα) προκύπτει ότι η αποA-I, υπό την μορφή δισκοειδών σωματιδίων (rHDL{αποA-I}) συνδέεται με υψηλή συγγένεια που φθάνει σε κορεσμό σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI. Υπάρχουν διαφορές στις τιμές της Bmax (350 έναντι 550 ng πρωτεΐνης ανά mg κυτταρικής πρωτεΐνης) οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην έκφραση του υποδοχέα SR-BI στα διαφορετικά πειράματα. Οι τιμές της φαινομενικής σταθεράς διάστασης (Kd_{app}) (0.5-1.5 μg πρωτεΐνης/ml) που λαμβάνονται με τις δύο μεθόδους φανερώνουν ότι η συγγένεια των δισκοειδών σωματιδίων που περιέχουν την αποA-I του πλάσματος είναι τουλάχιστον δεκαπλάσια της συγγένειας της σφαιρικής HDL (πυκνότητας 1.1-1.13 g/ml).

Η συμπεριφορά της ελεύθερης λιπιδίων αποA-I είναι εμφανώς πολύ διαφορετική από αυτή της αποA-I υπό την μορφή δισκοειδών σωματιδίων. Τα πειράματα ραδιο-

υποδοχέα και ανοδο-υποδοχέα έδειξαν ότι η αποA-I συνδέεται με το ίδιο τρόπο σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI, και σε κύτταρα μάρτυρες χωρίς να επέρχεται κορεσμός στην σύνδεση. Τα πειράματα σύνδεσης επαναλήφθηκαν χρησιμοποιώντας μεγάλο αριθμό παρασκευασμάτων πρωτεΐνης αποA-I, και τα αποτελέσματα δεν μπόρεσαν να επιβεβαιώσουν την SR-BI-εξαρτώμενη σύνδεση της ελεύθερης αποA-I.

Επίσης έγιναν και πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η φυσιολογική μορφή της HDL, πρε-β-1 HDL. Η πρε-β-1 HDL χρησιμοποιήθηκε τόσο σε πειράματα συναγωνισμού για την σύνδεση ^{125}I-HDL σε υποδοχέα SR-BI, όσο και σε πειράματα άμεσης σύνδεσης (με την τεχνική ραδιο και ανοσο-υποδοχέα) και φαίνεται ότι η πρε-β-1 HDL συναγωνίζεται ασθενώς για την σύνδεση της ^{125}I-HDL συγκριτικά με την HDL, ή δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποA-I}.

Όπως είναι γνωστό η στερεοδιαμόρφωση της αποA-I διαφέρει όταν είναι σε ελεύθερη μορφή, ή ενσωματωμένη σε σφαιρικά σωματίδια HDL, ή σε δισκοειδή σωματίδια rHDL{αποA-I} (78, 87, 88, 98, 140). Επομένως οι διαφορές που παρατηρούνται στις φαινομενικές Kd_{app} μεταξύ της σφαιρικής HDL ή των σωματιδίων rHDL{αποA-I}, μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην στερεοδιαμόρφωση της αποA-I στις επιφάνειες των σωματιδίων αυτών. Επίσης η διαφορετική διαμόρφωση της αποA-I σε ελεύθερη λιπιδίων μορφή μπορεί να είναι υπεύθυνη για την έλλειψη της μη ειδικής σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με την συμπεριφορά της φυσιολογικής μορφής της HDL (πρε-β-1 HDL), η οποία περιέχει αποκλειστικά αποA-I και μικρή ποσότητα φωσφολιπιδίων (98). Συνολικά οι προαναφερθείσες διαφορές στην στερεοδιαμόρφωση της αποA-I σε διαφορετικά σωματίδια μπορεί να επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο η αποA-I προσαρμόζεται στην περιοχή σύνδεσης (binding site) του υποδοχέα SR-BI. Επιπλέον είναι πιθανό ότι ο διαφορετικός αριθμός των μορίων της αποA-I, ανά σωματίδιο, και πιθανόν η διαφορετική διαμόρφωση των ελίκων της αποA-I μέσα σε ένα συγκεκριμένο σωματίδιο επηρεάζει την συγγένεια σύνδεσης της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI. Έχουν προταθεί δύο μοντέλα για την δομή των ελίκων της αποA-I στα δισκοειδή σωματίδια, το μοντέλο της ζώνης και το μοντέλο του φράκτη (74, 75, 79, 80). Και στα δύο μοντέλα η σύνδεση πολλαπλών μορίων αποA-I μπορεί να διευκολύνει την αλληλεπίδραση της με τον υποδοχέα SR-BI, προκαλώντας είτε διασύνδεση (cross linking) μεταξύ διπλανών μορίων υποδοχέων SR-BI είτε σύνδεση σε πολλαπλές ανεξάρτητες θέσεις στον ίδιο υποδοχέα, με συνέπεια την αύξηση της συγγένειας σύνδεσης.

γ) Επίδραση της πυκνότητας της HDL, που εξαρτάται από την σύσταση σε λιπίδια και απολιποπρωτεΐνες στην συγγένεια σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI

Η HDL του πλάσματος αποτελείται από σωματίδια που περιέχουν αποA-I (LpAI) ή αποA-I και αποA-II (Lp(AI:AII) (8, 85). Η πλειονότητα των Lp(AI) επιπλέει στην πυκνότητα των HDL_2, (πυκνότητα 1.063-1.125 gr/ml), ενώ η πλειονότητα των Lp(AI:AII) επιπλέει στην πυκνότητα των HDL_3. (πυκνότητα 1.125-1.21 gr/ml). Έχει δειχθεί ότι η HDL_2 και η HDL_3 περιέχουν 4 και 3 μόρια αποA-I ανά σωματίδιο αντίστοιχα (13).

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι εκτός από το σχήμα των σωματιδίων HDL (π.χ. δισκοειδή σε σχέση με σφαιρικά σωματίδια), η επί τοις εκατό σύσταση των σωματιδίων HDL σε λιπίδια μπορεί να επηρεάζει την συγγένεια σύνδεσής τους στον υποδοχέα SR-BI.

Πειράματα άμεσης σύνδεσης έδειξαν ότι τα σωματίδια HDL διαφορετικής πυκνότητας συνδέονται με διαφορετικές συγγένειες στον υποδοχέα SR-BI. Συγκεκριμένα τα χαμηλότερης πυκνότητας κλάσματα HDL έχουν μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI. Επίσης πειράματα συναγωνισμού για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI από κλάσματα διαφορετικών πυκνοτήτων HDL έδειξαν ότι η συγγένεια της HDL για σύνδεση στον SR-BI μειώνεται όσο αυξάνεται η πυκνότητά της HDL. Η μείωση στην συγγένεια μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στα μεγέθη ή στην σύσταση των σωματιδίων της HDL (πχ αριθμός μορίων αποA-I ανά σωματίδιο), ή και στις δύο αιτίες, με αποτέλεσμα να αλλάζει κάθε φορά ο τρόπος με τον οποίο η αποA-I προσαρμόζεται στην περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα SR-BI.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η ελεύθερη αποA-I και η πρε-β-1 μορφή της HDL δεν εμφανίζουν ειδική σύνδεση στον υποδοχέα SR-BI συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση της αποA-I με λιπίδια παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνδεση των σφαιρικών ή δισκοειδών σωματιδίων που περιέχουν αποA-I με τον υποδοχέα SR-BI. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η σύσταση σε λιπίδια των πρε-β-1 HDL όπως και η στερεοδιαμόρφωση της αποA-I στα πρε-β-1 HDL σωματίδια διαφέρει από αυτή της σφαιρικής HDL (98, 376). Αυτές οι διαφορές πιθανώς να προκαλούν τις διαφορές στην διαφορετική συγγένεια αυτών των σωματιδίων για τον υποδοχέα SR-BI.

Με βάση τα δεδομένα αυτά και πολλές άλλες προηγούμενες μελέτες (264, 299, 302, 304, 305, 350, 351) μπορούμε να προτείνουμε τα εξής: ο υποδοχέας SR-BI συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια με τα μεγάλα, σχετικά χαμηλής πυκνότητας,

σωματίδια HDL που είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης για να μεγιστοποιήσει την αποτελεσματική μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης στα κύτταρα-στόχους. Η υπόθεση αυτή είναι συμβατή με παρατηρήσεις που φανερώνουν ότι απουσία του υποδοχέα SR-BI σε πειραματόζωα (304), τα σωματίδια της HDL έχουν εξαιρετικά μεγάλα μεγέθη. Έχει δειχθεί ότι τα μεγαλύτερα σωματίδια HDL έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημίσσειας ζωής στο πλάσμα των πειραματοζώων (fractional catabolic rates),_παρά τα μικρότερα σωματίδια HDL (377). Είναι πιθανό ο υποδοχέας SR-BI να δρα με δύο τρόπους: α) προάγει την μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης από την HDL που είναι πλούσια σε λιπίδια σε κύτταρα-στόχους (ήπαρ, στεροειδογενείς ιστούς) και β) συμμετέχει στον μετασχηματισμό των σωματιδίων της HDL, δημιουργώντας μικρότερα σωματίδια, σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες όπως λιπάσες και CETP (119, 120, 121, 124, 125, 127, 264). Τα μικρότερα σωματίδια της HDL που συνδέονται με χαμηλότερη συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI ενδέχεται να αποτελέσουν υποστρώματα για την δημιουργία των μεγαλυτέρων σωματιδίων HDL, που είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης. Η μετατροπή αυτή μπορεί να επιτελείται με την δράση του προϊόντος του γονιδίου ABC1 (206-210) και του ενζύμου LCAT. Εναλλακτικά τα μικροτέρου μεγέθους σωματίδια μπορεί να καταβολίζονται μετά από φιλτράρισμα από το νεφρό, πιθανώς μέσω ενδοκύτωσης που πιθανόν γίνεται μέσω της κουβιλίνης (128, 129).

δ) Επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I στην σύνδεση με τον υποδοχέα SR-BI

Στην προσπάθεια χαρτογράφησης πιθανών περιοχών της αποA-I που είναι υπεύθυνες για την σύνδεση στον υποδοχέα SR-BI χρησιμοποιήθηκαν οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I που στερούνται το καρβοξυτελικό ή το αμινοτελικό τμήμα τους. Για τις μελέτες αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I ανασυγκροτήθηκαν σε δισκοειδή σωματίδια rHDL με την μέθοδο της διαπίδυσης παρουσία χολικού νατρίου.

Σε αρχικό στάδιο μελετήθηκε η επίδραση του προπεπτιδίου της αποA-I στην ικανότητα σύνδεσης των rHDL{αποA-I} σωματιδίων στον υποδοχέα SR-BI. Η παρουσία του προπεπτιδίου των 6 αμινοξέων της αποA-I δεν φαίνεται να παρεμποδίζει την σύνδεση στον υποδοχέα SR-BI. Τα σωματίδια rHDL που περιέχουν τον ανασυνδυασμένο φυσικό τύπο αποA-I (που παράγεται από τα C127 κύτταρα ως προ-αποA-I μορφή) συναγωνίζονται με την ίδια αποτελεσματικότητα με σωματίδια rHDL που περιέχουν την ώριμη μορφή του πλάσματος για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI.

Η ικανότητα των καρβοξυτελικών μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I να συνδέονται στον υποδοχέα SR-BI μελετήθηκε αρχικά με πειράματα συναγωνισμού. Τα σωματίδια rHDL που περιέχουν αποA-I με καρβοξυτελικές απαλοιφές συναγωνίζονται με πολύ μεγάλη αποτελεσματικότητα για την σύνδεση της ^{125}I-HDL στον SR-BI. Πειράματα σύνδεσης έδειξαν ότι τα δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν την αποA-I: Δ(185→243) συνδέονται με υψηλή συγγένεια στον SR-BI, σε μία κατηγορία θέσεων με φαινομενική σταθερά διάστασης (Kd_{app}) 3.23 μg πρωτεΐνης/ml και φαινομενικό $Bmax_{app}$ 326 ng πρωτεΐνης/mg ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης. Αυτό φανερώνει ότι η απαλοιφή ενός μεγάλου μέρους της καρβοξυτελικής περιοχής της αποA-I (αμινοξέα 185-243) δεν επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα της πρωτεΐνης, όταν είναι ενσωματώμενη σε δισκοειδή σωματίδια, να συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI. Οι μικρές διαφορές στις τιμές της σταθεράς Kdapp σε σχέση με τον φυσικό τύπο αποA-I μπορεί να αντικατοπτρίζουν διαφορές στα μεγέθη των σωματιδίων rHDL που προκύπτουν λόγω της μετάλλαξης.

Στις μελέτες της ικανότητας σύνδεσης μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I στον υποδοχέα SR-BI χρησιμοποιήθηκαν και η αμινοτελική μετάλλαξη αποA-I: Δ(1→59) και η διπλή μετάλλαξη αποA-I: Δ(1→59)(185→243). Βρέθηκε ότι τα σωματίδια rHDL που περιέχουν την μορφή αποA-I: Δ(1→59) συνδέονται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI και συναγωνίζονται ισχυρά για την πρόσδεση της ^{125}I-HDL σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SR-BI. Τα σωματίδια rHDL που περιέχουν την διπλή μετάλλαξη αποA-I: Δ(1→59)(185→243) συναγωνίζονται ασθενώς για την πρόσδεση της ^{125}I-HDL στον υποδοχέα SR-BI και πιθανώς συνδέονται με μειωμένη συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ισχυρή σύνδεση των δισκοειδών rHDL στον SR-BI μπορεί να επιτευχθεί με την κεντρική περιοχή του μορίου της αποA-I (αμινοξέα 60-184), σε συνδυασμό με είτε την καρβοξυτελική είτε την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης. Είναι λοιπόν πιθανό ότι οι δύο περιοχές αυτές της αποA-I (αμινοτελική και καρβοξυτελική) μπορούν να συνδέονται ανεξάρτητα στον υποδοχέα SR-BI. Σε συμφωνία με την ερμηνεία αυτή είναι μια πρόσφατη εργασία, η οποία έδειξε ότι δισκοειδή σωματίδια rHDL που περιέχουν πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν την αμινο- (1-85) ή την καρβοξυ- (149-243) τελική περιοχή της αποA-I συνδέονται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα SR-BI (378). Μία εναλλακτική ερμηνεία μπορεί να είναι ότι και οι δύο τερματικές περιοχές επηρεάζουν την στερεοδιαμόρφωση της κεντρικής

περιοχής της αποA-I που είναι βασική για την σύνδεση των σωματιδίων rHDL στον υποδοχέα SR-BI. Έτσι είναι πιθανό ότι οι κεντρικές έλικες (αμινοξέα 60-184) σε μια σωστή στερεοδιαμόρφωση συμβάλλουν ανεξάρτητα στην σύνδεση στον υποδοχέα. Η μειωμένη συγγένεια της διπλής μεταλλαγμένης μορφής της αποA-I (αποA-I: Δ(1→59)(185→243)) μπορεί να είναι το αποτέλεσμα τροποποιημένης στερεοδιαμόρφωσης των κεντρικών ελίκων λόγω της μετάλλαξης. Τα υπάρχοντα δεδομένα δεν μας επιτρέπουν να καθορίσουμε επακριβώς που βρίσκονται μέσα στο μόριο της αποA-I οι θέσεις σύνδεσης για τον SR-BI. Εντούτοις η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει τον σημαντικό ρόλο της αποA-I στην σύνδεση της HDL στον υποδοχέα SR-BI και υποδεικνύει ότι η καρβοξυτελική και η αμινοτελική περιοχή του μορίου της αποA-I επηρεάζουν με ανεξάρτητο μηχανισμό την σύνδεση στον υποδοχέα SR-BI, είτε άμεσα, είτε μέσω αλλαγών στην στερεοδιαμόρφωση της κεντρικής περιοχής της αποA-I (αμινοξέα 60-184).

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

1) Φυσικοχημικές μελέτες

Οι μεταλλαγμένες μορφές, οι οποίες παρουσίασαν μειωμένη έκκριση από τα κύτταρα και σταθερότητα (αποA-I: Δ(165→243) και αποA-I: Δ(175→243)) πιθανόν να μπορούν να παραχθούν με χρήση του συστήματος έκφρασης που βασίζεται στον βακιλοϊό ή τον ανασυνδυασμένο αδενοϊό, για να μελετηθεί η λειτουργία και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Επίσης είναι πιθανή η φυσικοχημική ανάλυση των διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της αποA-I υπό την μορφή σωματιδίων rHDL συνδεδεμένων με λιπίδια. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μελετηθεί η ταυτόχρονη επίδραση της μετάλλαξης και των λιπιδίων στην σταθερότητα και την στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης.

2) Περαιτέρω ανάλυση των περιοχών της αποA-I που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, και την σύνδεση με λιπίδια

Η επιλογή και η αντικατάσταση αμινοξέων σε κεντρικές και καρβοξυτελικές περιοχές της αποA-I θα ήταν χρήσιμη για την διευρεύνηση της συμβολής τους στην σύνδεση με λιπίδια και ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Στο στάδιο αυτό θα γίνει σημειακή μεταλλαξιγένεση, η οποία θα δώσει σαφέστερη πληροφορία για την συμμετοχή επιμέρους αμινοξέων στη δομή και τις λειτουργίες της αποA-I.

3) Επίδραση των μεταλλάξεων της αποA-I στην ικανότητα σύνδεσης με την HDL

Πιστεύεται ότι η αλληλεπίδραση της αποA-I, και συγκεκριμένα της καρβοξυτελικής περιοχής με φωσφολιπίδια ακολουθεί παρόμοιο μηχανισμό με την σύνδεση της πρωτεΐνης με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Κατά συνέπεια θα ήταν χρήσιμο να μελετηθούν όλες οι μεταλλάξεις και κυρίως οι μορφές που φέρουν τις μικρές εσωτερικές απαλοιφές των 10 αμινοξέων (165-175 και 187-197) στην ικανότητά τους να συνδέονται με την HDL. Η μελέτη αυτή ενδέχεται να δώσει πληροφορίες για την ορθότητα του μοντέλου ζώνης που προσπαθεί να ερμηνεύσει τον τρόπο πρόσδεσης της αποA-I στην HDL.

4) Περιοχές της αποA-I που συμβάλλουν στην πρόσδεση με την κουβιλίνη

Οι υπάρχουσες μεταλλάξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της σύνδεσης της αποA-I και των σωματιδίων rHDL με τον υποδοχέα της κουβιλίνης.

5) Περιοχές της αποA-I που συνεισφέρουν στην έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα και την πρόσδεση στο προϊόν του γονιδίου ABC1.

Οι υπάρχουσες μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I, ελεύθερες λιπιδίων ή υπό την μορφή των σωματιδίων rHDL, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της ικανότητας τους να προκαλέσουν την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα ή την πιθανή σύνδεσή τους στο προϊόν του γονιδίου ABC1.

6) Μελέτη επιλεγμένων μεταλλάξεων in vivo (σε πειραματόζωα)

Οι μεταλλαγμένες μορφές της αποA-I που έχουν μειωμένη ικανότητα σύνδεσης με λιποσώματα φωσφολιπιδίων και με την HDL μπορούν να μελετηθούν με γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών ή σε διαγονιδιακά ποντίκια για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ανωτέρω μεταλλάξεις επηρεάζουν τον σχηματισμό και τις λειτουργίες της HDL.

7) Συμβολή των περιοχών της αποA-I στην σύνδεση στον υποδοχέα SR-BI και την επιλεκτική είσοδο της χοληστερόλης στο κύτταρο.

Θα μελετηθεί η επίδραση επιλεγμένων μεταλλάξεων στην κεντρική περιοχή της αποA-I, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν την σύνδεση της με τον υποδοχέα SR-BI και πιθανόν και την επιλεκτική μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης στο κύτταρο. Τέτοιες μεταλλάξεις μπορεί να αφορούν την αντικατάσταση φορτισμένων από ουδέτερα αμινοξέα, ή μικροτέρων τμημάτων στην κεντρική περιοχή της αποA-I.

Οι μεταλλάξεις αυτές θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα σύνδεσης στον υποδοχέα SR-BI και επιλεκτικής μεταφοράς των εστέρων της χοληστερόλης της HDL σε κύτταρα.

8) Δομική ανάλυση της αποA-I

Θα μπορούσαν να δημιουργηθούν σημειακές μεταλλάξεις σε ειδικά συγκεκριμένα αμινοξέα, που βασίζονται στο μοντέλο διπλής ζώνης που έχει περιγραφεί για την σύνδεση της αποA-I σε δισκοειδή σωματίδια rHDL. Οι επιλεγμένες μεταλλάξεις σε συνδυασμό με το μοντέλο της διπλής ζώνης ενδέχεται να μπορέσουν να εξηγήσουν τις βασικές λειτουργίες της αποA-I που εξαρτώνται από την σύνδεσή της με λιπίδια, όπως η βιογένεση της HDL, η ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT, και η σύνδεση της με τον υποδοχέα SR-BI.

1. Gotto, A. M. Jr., Pownall, H. J., Havel, R. J. 1986. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.,* 128., pp: 3-41

2. Zannis, V. I., Kardassis, D., Zanni, E. E. 1993. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors and their enzymes. *Adv. Hum. Genetics* (H. Harris and K. Hirschhorn, editors). Plenum Press, N.Y, 21., pp: 145-319

3. Alaupovic, P. 1971. Conceptual development of the classification systems of plasma lipoproteins. *Protides of the Biological Fluids,* (H. Peeters, ed), Pergamon Press, Oxford, pp: 9-20

4. Smith, L., Pownall, H. J., Gotto, A. M. 1978. The plasma lipoproteins*:* Structure and metabolism. *Annu. Rev. Biochem*., 47., pp: 751-778

5. Rothblat, G. H., Bamberger, M., Phillips, M. C. 1986. Reverse cholesterol transport. *Methods Enzymol*., 129., pp: 628-644

6. Doolittle, M. H., Wong, H., Davis, R. C., Schotz, M. C. 1987. Synthesis of hepatic lipase in liver and extrahepatic tissues. *J. Lipid Res.,* 28., pp: 1326-1334

7. Brown, M. S., Goldstein, J. L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 52., pp: 223-261

8. Cheung, M. C., Alberts, J. J. 1984. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. *J. Biol. Chem*., 259., pp: 12201-12209

9. Herbert, P. N., Assmann, G., Gotto, A. M. Jr., Fredrickson, D. S. 1982. Familial lipoprotein deficiency: Abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia, and Tangier disease, in: *'The metabolic basis of inherited disease'* (J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein, M. D. Brown, editors), Mc Graw-Hill, N.Y., pp: 589-651

10. Zannis, V. I., Breslow, J. L. 1985. Genetic mutation affecting human lipoprotein metabolism. *Adv. Hum. Genet.,* 14., pp: 125-215, 383-386

11. Laggner, P., Muller, K., Kratky, O., Kostner, G., Holasek, A. 1973. Studies on the structure of lipoprotein A of human high density lipoprotein HDL3: The spherically averaged electron density distribution. *F. E. B. S. Lett.,* 33., 77

12. Hamilton, R. L., Williams, M. C., Fielding, C., Havel, R. J. 1976. Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J. Clin. Invest.,* 58., 667-680

13. Eisenberg, S. 1984. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.,* 25., pp: 1017-1058

14. Heiss, G., Tyroler, H. 1982. In: *Proceedings of the Workshop on Apolipoprotein Quantification*, NIH Publ., No. 83-1266. U. S. Dept. Health and Human Services, NIH, Bethesda, Maryland, pp: 7-24

15. Castelli, W. P., Doyle, J. T., Gordon, T., Hames, C. G., Hjortland, M. C., Holley, S. B., Kagan, A., Zukel, W. J. 1977. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease: The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation,* 55., pp: 767-772

16. Anderson, K. M., Wilson, P. W. F., Odell, P. M., Kannel, W. B. 1991. An updated coronary risk profile: A statement for health professionals. *Circulation,* 8., pp: 356-362

17. Glueck, C. J., Gartside, P., Fallat, R. W., Sielski, J., Steiner, P. M. 1976. Longevity syndromes: Familial hypobeta- and hyperalphalipoproteinemia. *J. Lab. Clin. Med.,* 88., pp: 941-957

18. Li, W. H., Tanimura, M., Luo, C. C., Datta, S., Chan, L. 1988. The apolipoprotein multigene family: Biosynthesis, structure, structure-function relationships and evolution. *J. Lipid Res.,* 29., pp: 245-271

19. Fielding, C. J., Shore, V. G., Fielding, P. E. 1972. A protein cofactor for lecithin cholesterol acyltransferase. *BBRC.,* 46., pp: 1493-1498

20. Chen, C. H., Albers, J. J. 1985. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta,* 836., pp: 279-285

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

22. Liadaki, K., N., Liu, T., Xu, S., Ishida, B. Y., Duchateaux, P. N., Krieger, J. P., Kane, J., Krieger, M., Zannis, V. I. 2000. Binding of HDL and rHDL to the HDL receptor SR-BI: Effect of lipid association and apoA-I mutations on receptor binding. *J. Biol. Chem.,* 275., pp: 21262-21271

23. Kowal, R. C., Herz, J., Weisgraber, K. H., Malhey, R. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L. 1990. Opposing effects of apolipoprotein E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.,* 265., pp: 10771-10779

24. Krauss, R. M., Herbert, P. N., Levy, R. I., Fredrickson, D. S. 1973. Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ. Res.,* 33., pp: 403-411

25. Soutar A.K., Garner C.W., Baker H.N., Sparrow J.T., Jackson R.L., Gotto A.M., Smith L.C. 1975. Effect of the human plasma apolipoproteins and phopshatidyl choline acyl donor on the relative. *Biochemistry*., 14., pp: 3057-3064

26. Fidge, N. H. 1999. HDL receptors, binding proteins and ligands. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 187-201

27. Barkia, A., Puchois, P., Ghalim, P., Torpier N., Barbaras, G., Ailhaud R., and Fruchard, J.C. 1991. Differential role of apolipoprotein AI-containing particles in cholesterol efflux from adipose cells. *Atherosclerosis,* 87: 135-146

28. Forte, T.M., R. Goth-Goldstein, R. W. Nordhausen, M. R. McCall. 1993. Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles. *J. Lipid Res.,* 34., pp: 317-324

29. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortand, M. C., Kannel, W. B., Dawber, T. R. 1977. Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. The Framingham study. *Annals of Internal Medicine*, 87., pp: 393-397

30. Reichl, D., Miller, N. E. 1989. Pathophysiology of reverse cholesterol transport. Insights from inherited disorders of lipoprotein metabolism. *Atheriosclerosis,* 9., pp: 785-797

31. Schaefer, E. J. 1984. Clinical, biochemical, and genetic features in familial disorders of high density lipoprotein deficiency. *Atheriosclerosis.,* 4., pp: 303-322

32. Breslow, J. L. 1989. *The metabolic basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill, pp: 1251-1266

33. Funke, H., von Eckardstein, A., Pritchard, P. H., Karas, M., Albers, J. J., Assmann, G. A. 1991. A frameshift mutation in the human apolipoprotein A-I gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin cholesterol acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *J. Clin. Invest.,* 87., pp: 371-376

34. Deeb, S. S., Cheung, M. C., Peng, R., Wolf, A. C., Stern, R., Albers, J. J., Knopp, R. H. 1991. A mutation in the human apolipoprotein A-I gene. Dominant effect on the level and characteristics of plasma high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.,* 266., pp: 13654-13660

35. Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G., Clift, S. M. 1991. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I. *Nature,* 353., pp: 265-267

36. Duverger, N., Kruth, H., Emmanuel, F., Caillaud, J. M., Viglietta, C., Castro, G., Tailleux, A., Fievet, C., Fruchart, J. C., Houdebine, L. M., Denefle, P. 1996. Inhibition of

atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation*, 94., pp: 713-717

37. Baimon, J. J., Badimon, L., Fuster, V. 1990. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol fed rabbit. *J. Clin. Invest.,* 85., pp: 1234-1241

38. Li, H., Reddick, R. L., Maeda, N. 1993. Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Atheroscler. Thrombos.,* 13., pp: 1814-1821

39. Voyiaziakis, E., Goldberg, I. J., Plump, A. S., Rubin, E. M., Breslow, J. L., Huang, L. S. 1998. ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice. *J. Lipid Res.,* 39., pp: 313-321

40. Karathanasis, W. K., Zannis, V. I., Breslow, J. L. 1983. Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 80., pp: 6147-6151

41. Karathanasis, S. K., McPherson, J., Zannis, V. I., Breslow, J. L. 1983. Linkage of human apolipoprotein A-I and C-III genes. *Nature,* 304., pp: 371-373

42. Karathanasis, S. K. 1985. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 82., pp: 6374-6378

43. Cheung, P., Kao, F. T., Law, M. L., Jones, C., Puck, T. T., 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. USA*., 81., pp: 508-511

44. Zannis, V. I., Kardassis, D., Cardot, P., Hatzopoulou-Cladaras, M., Zanni, E. E., Cladaras, C. 1992. Molecular biology of the human apolipoprotein genes: gene regulation and structure-function relationship. Curr. Opin. Lipid., 3., pp: 96-113

45. Widom, R. L., Ladias, J. A., Kouidou, S., Karathanasis, S. K. 1991. Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells. *Mol. Cell. Biol.,* 11., pp: 677-687

46. Rottman, J.N., Widom, R.L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V., Karathanasis, S.K. 1991. A retinoid acid-responsive element in the apoA-I gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol. Cell. Biol.,* 11., pp: 3814-3820

47. Tzameli, I., Zannis, V.I. 1996. Binding specificity and modulation of the apoA-I promoter activity by homo and heterodimers of nuclear receptos. *J. Biol. Chem.,* 71, pp: 8402-8415

48. Kardassis, D., Laccotrippe, M., Talianidis, I., Zannis, V. I. 1996. Transcriprional regulation of the genes involved in lipoportein transport. The role of proximal promoters and long-range regulatory elements and factors in apolipoprotein gene regulation. *Hypertension*, 27., pp: 980-1008

49. Kan, H. Y., Georgopoulos, S., Zannis, V. I. 2000. A hormone response element in the human 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.,* IN PRESS

50. Lenich, C., Brecher, P., Makrides, S., Chobanian, A., Zannis, V. I., 1988. Apolipoprotein gene expression in the rabbit: abundance, size and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues. *J. Lip. Res.,* 29., pp: 755-764

51. Stacls, B., Auwerx, J., Chan, L., van Tol, A., Rosseneu, M., Verhoeven, G. 1989. Influence of development, estrogens, and food intake on apolipoprotein A-I, A-II, and E mRNA in rat liver and intestine. *J. Lip. Res.,* 30., pp: 1137-1145

52. Cheung, P., Chan, L. 1983. Nucleotide sequence of cloned cDNA of human apolipoprotein A-I. *Nucl. Acids Res.,* 11., pp: 3703-3715

53. Zannis, V. I., Karathanasis, S. K., Kentmann, H. T., Goldberger, G., Breslow, J. L. 1983. Intracellular and extracellular processing of human apoA-I. Secreted apoA-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 80., pp: 2574-2578

54. Gordon, J. I., Sims, H. F., Lentz, S. R., Edelstein, C., Scanu, A. M., Strauss, A. W. 1983. Proteolytic processing of human preproapolipoprotein A-I. A proposed defect in the conversion of proA-I to A-I in Tangier's disease. *J. Biol. Chem*., 258., pp: 4037-4044

55. Steiner, D. F., Quinn, P. S., Chan, S. J., Marsh, J., Tager, H. S. 1980. Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* 343., pp: 1-16

56. Baker, H. N., Gotto Jr, A. M., Jackson, R. L. 1975. The primary structure of human plasma high density apolipoprotein glutamine I (apoA-I). II. The amino acid sequence and alignment of cyanogens bromide fragments IV, III, and I. *J. Biol. Chem*., 250., pp: 2725-2738

57. Brewer Jr, H. B., Fairwell, T., Larve, A., Ronan, R., Houser, A., Bronzert, T. 1978. The amino acid sequence of human apoA-I, an apoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem. Biophys Res. Commun*. 80., pp: 623-630

58. Zannis, V. I., Lees, A. M., Lees, R. S., Breslow, J. L. 1982. Abnormal apoprotein A-I isoprotein composition in patients with Tangier disease. *J. Biol. Chem.,* 257, pp: 4978-4986

59. Barker, W. C., Dayhoff, M. 1977. Evolution of lipoproteins deduced from protein sequence data. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Biochem.***,** 57., pp: 309-315

60. McLachlin, A. D. 1977. Repeated helical pattern in apolipoprotein A-I. *Nature,* 267., pp: 465-466

61. Nolte, R. T., Atkinson, D. 1992. Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. *Biophys. J.,* 63., pp: 1221-1239

62. Segrest, J. P., Jackson, R. I., Morrisett, J. D., Gotto, A. M. 1974. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.,* 38., pp: 247-253

63. Fukushima, D., Kupferberg, J. P., Kokoyama, S., Kroon, D. J., Kaiser, E. T., Kezdy, F. J. 1979. A synthetic amphipathic helical docosapeptide with the surface properties of plasma apolipoprotein A-I. *J. Am. Chem. Soc.,* 101., pp: 3703-3704

64. Wilson, C., Wardell, M. R., Weisberger, K. H., Malhey, R. W., Agard, D. A. 1991. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of the human apolipoprotein E. *Science*, 252., pp: 1817-1822

65. Ryan, R. O., Oikawa, K., Kay, C. M. 1993. Conformational, thermodynamic, and stability properties of Manduca Sexta apolipophorin III. *J. Biol. Chem.,* 268., pp: 1525-1530

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

67. Rogers, D. P., Roberts, L. M., Lebowitz, J., Engler, J. A., Brouillette, C. G. 1998. Structural analysis of apolipoprotein A-I: Effects of amino- and carboxy-terminal deletions on the lipid-free structure. *Biochemistry,* 37., pp: 945-955

68. Gursky, O., Atkinson, D. 1996. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-I: Implications for a lipid-free molten globular state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 93., pp: 2991-2995

69. Davidson, W. S., Arnvig-McGuire, K., Kennedy, A., Kosman, J., Hazlett, T.L., Jonas, A. 1999. Structural organization of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I: studies of tryptophan mutants. *Biochemistry,* 38., pp: 14387-14395

70. Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A., 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., pp: 12291-12296

71. Rogers, D. P., Brouillette, C. G., Engler, J. A., Tendian, S. W., Roberts, L., Mishra, V. K., Anantharamaiah, G. M., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Ray, M. J. 1997. Truncation of the amino terminus of human apolipoprotein A-I substantially alters only the lipid-free conformation. *Biochemistry,* 36., pp: 288-300

72. Wlodawer, A., Segrest, J. P., Chung, B. H., Chiovetti, R. Jr., Weinstein, J. N. 1979. High-density lipoprotein recombinants: evidence for a bicycle tire micelle structure obtained by neutron scattering and electron microscopy. *FEBS Lett*., 104., pp: 231-235

73. Atkinson, D., Small, D. M., Shipley, G. G. 1980. X-ray and neutron scattering studies of plasma lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci USA.,* 348., pp: 284-298

74. Segrest, J. P, Jones, M. K., Klon, A. E., Sheldahl, C. J., Hellinger, M. De Loof H., Harvey, S. C. 1999. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal hihg density lipoprotein. *J. Biol. Chem.,* 274., pp: 31755-31758

75. Koppaka, V., Silvestro, L., Engler, J. A., Brouillette, C. G., Axelsen, P. H. 1999. The structure of human lipoprotein A-I. Evidence for the "belt" model. *J Biol Chem*., 274., pp: 14541-14544

76. Wald, J. H., Coormaghtigh, E., De Meutter, J., Ruysschaert, J. M., Jonas, A. 1990. Investigation of the lipid domains and apolipoprotein orientation in reconstituted high density lipoproteins by fluorescence and IR methods. *J. Biol. Chem.,* 265., pp: 20044-20050

77. Vanloo, B., Demoor, L., Boutillon, C., Lins, L., Brasseur, R., Baert, J., Fruchart, J. C., Tartar, A., Rosseneu, M. 1995. Association of synthetic peptide fragments of human apolipoprotein A-I with phospholipids. *J Lipid Res.,* 36., pp: 1686-1696

78. Tall, A. R., Small, D. M., Deckelbaum, R. J., Shipley, G. G. 1977. Structure and thermodynamic properties of high density lipoprotein recombinants. *J. Biol. Chem.,* 252., pp: 4701-4711

79. Phillips, J. C., Wriggers, W., Li, Z., Jonas, A., Schulten, K. 1997. Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high- density lipoprotein disks. *Biophys. J*., 73., pp: 2337-2346

80. Segrest, J. P., Li, L., Anantharamaiah, G. M., Harvey, S. C., Liadaki, K. N., Zannis, V. I. 2000. Structure and funstion of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Current Opin. Lipid.,* 11., pp: 105-115

81. von Eckardstein, A., Funke, H., Walter, M., Altland, K., Benninghoven, A., Assmann, G. 1990. Structural analysis of human apoliporpotein A-I variants. Amino acid

substitutions are nonrandomly distributed throughout the apolipoprotein A-I primary structure. *J. Biol. Chem.,* 265., pp: 8610-8617

82. Daum, U, Langer, C., Duverger, N., Emmanuel,F., Benoit,A., Denefle, P., Chirazi, A., Cullen, P., Pritchard, H. P., Brucket, E., Assmann, G., von Eckardstein, A. 1999. Apolipoprotein AI (R151C) paris is defective in activation of lecithin choletserol acyltransferase but not in the initianl lipid binding, formation of reconstituted lipoproteins, or promotion of cholesterol efflux. *J. Mol. Med*., 77., pp: 614-622

83. Franceschini, G., Calabresi, L., Tosi, C., Gianfranceschi, G., Sirtori, C. R., Nichols, A. V. 1990. Apolipoprotein AI milano. Disulfide-linked dimmers increase high density lipoprotein stability and hinder particle interconversion in carrier plasma. *J. Biol. Chem.,* 265., pp: 12224-12231

84. Chung, B. H., Segrest, J. P., Ray, M. J., Brunzell, J. D., Hokanson, J. E., Krayss, R. M., Beaudrie, K., Cone, J. T. 1986. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol.,* 128., pp: 181-209

85. Fruchart, J. C., Ailhaud, G. 1992. Apolipoprotein A-containing particles: physiological role, quantification and clinical significance. *Clin. Chem.,* 38., pp: 793-797

86. Havel, R. J., Kane, J. P. 1982. Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoportens. The metabolic Basis of inherited disease (C. R. Scriver, A. I. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, editors), McGraw-Hill, N.Y., pp: 1129-1138

87. Sparks, D. L., Phillips, M. C., Lund-Katz, S. 1992. The conformation of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. 13C NMR studies of lysine ionization behavior. *J. Biol.Chem*., 267., pp: 25830-25838

88. Sparks, D. L., Lund-Katz, S., Phillips, M. C. 1992. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem*., 267., pp: 25839-25847

89. Sparks, D. L., Lund-Katz, S., Davidson, W. S., Phillips, M. C. 1995. Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability. *J. Biol. Chem.,* 270., pp: 26910-26917

90. Parks, J. S., Gebre, A. K. 1997**.** Long-chain polyunsaturated fatty acids in the sn-2 position of phosphatidylcholine decrease the stability of recombinant high density lipoprotein apolipoprotein A-I and the activation energy of the lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.,* 38., pp: 266-275

91. Palgunachari, M. N., Mishra, V. K., Lund-Katz, S, Phillips, M.C., Adeyeye, S. O., Alluri, S., Anantharamaiah, G.M., Segrest, J.P. 1996. Only the two end helixes of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity. Implications for HDL assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*., 16., pp: 328-338

92. Mishra, V. K., Palgunachari, M. N., Datta, G., Phillips, M. C., Lund-Katz, S., Adeyeye, S. O., Segrest, J. P., Anantharamaiah, G. M. 1998. Studies of synthetic peptides of human apolipoprotein A-I containing tandem amphipathic alpha-helixes. *Biochemistry.* 37., pp: 10313- 10324

93. Rogers, D.P., L.M. Roberts, J. Lebowitz, G. Datta, G.M. Anantharamaiah, J.A. Engler, C.G. Brouillette. 1998. The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: Effects of amino-terminal deletions. *Biochemistry.* 37., pp: 11714-11725

94. Frank, P. G., Bergeron, J., Emmanuel, F., Lavigne, J. P., Sparks, D. L., Denefle, P., Rassart, E., Marcel, Y.L. 1997. Deletion of central alpha-helices in human apolipoprotein A-I: effect on phospholipid assocaition. *Biochemistry,* 36., pp: 1798-1806

95. Laccotrippe, M., Makrides, S. C., Jonas, A., 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., pp: 17511-17522

96. Davidson, W. S., Sparks, D. L., Lund-Katz, S., Phillips, M. C. 1994. The molecular basis for the difference in charge between pre-beta and alpha-migrating high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.,* 269., pp: 8959-8965

97. Kunitake, S.T., Mendel, C. M., Hennessy, L. K. 1992. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic modilities. *J. Lipid Res.,* 33., pp: 1807-1816

98. Fielding, C., Fielding, P. E. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res*., 36., pp: 211-228

99. Francone, O. L., Gurakar, A., Fielding, C. 1989. Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. *J. Biol. Chem*., 264., pp: 7066-7072

100. Ishida, B. Y., Albee, D., Paigen, B. 1990. Interconversion of pre-beta migrationg lipoporteins containing apoliporpotein A-I and HDL. *J. Lipid Res.,* 31., pp: 227-236

101. Miida, T., Kawano, M., Fielding, C. J., Fielding, P. E. 1992. Regulation of the concentration of pre beta high-density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Biochemistry,* 31., pp: 11112-11117

102. Francone, O. L., Gong, E. L., Ng, D.S, Fielding, C. J., Rubin, E. M. 1995. Expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase in transgenic mice. Effect of human apolipoprotein AI and human apolipoprotein AII on plasma lipoprotein cholesterol metabolism. *J. Clin. Invest*., 96., pp: 1440-1448

103. Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S., Maeda, N., Assmann, G. 1994. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 91., pp: 1834-1838

104. Duverger, N., Ghalim, N., Ailhaud, G., Steinmetz, A., Fruchart, J. C., Castro, G. 1993. Characterization of apoA-IV-containing lipoprotein particles isolated from human plasma and interstitial fluid. *Atheriosclerosis and Thrombosis,* 13., pp: 126-132

105. von Eckardstein, A., Huang, Y., Assmann, G. 1994. Psysiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr. Opin. Lipid*., 5., pp: 404-416

106. Gillotte, K. L., Davidson, W. S., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., Phillips, M. C. 1998. Removal of cellular cholesterol by pre-beta-HDL involves plasma membrane microsolubilization. *J. Lipid Res.,* 39., pp: 1918-1928

107. Fielding, C. J. 1990. Lecithin: Cholesterol acyltransferase. In: *Advances in Cholesterol Research.* (M. Esfahani and J. B. Swaney, editors), Telford Press, New Jersey., pp: 271-314

108. Patsch, J. R., Prasad, S., Gotto, A. M., Bengtsson-Olivecrona, G. 1984. Postprandial lipemia. A key for the conversion of high density lipoprotein2 into high density lipoprotein3 by hepatic lipase. *J. Clin. Invest.,* 74., pp: 2017-2023

109. Grundy, S. M., Vega, G. L., Otvos, J. D., Rainwater, D. L., Cohen, J. C. 1999. Hepatic lipase activity influences high density lipoprotein subclass distribution in normotriglyceridemic men. Genetic and pharmacological evidence. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 229-234

110. Guendouzi, K., Jaspard, B., Barbaras, R., Motta, C., Vieu, C., Marcel, Y., Chap, H., Perret, B., Collett, X. 1999. Biochemical and physical properties of remnant-HDL2 and of preβ1-HDL produced by hepatic lipase. *Biochemistry,* 38., pp: 2762-2768

111. Jaye, M., Lynch, K. J., Krawiec J., Marchadier, D., Maugeais, C., Doan, K., South, V., Amin, D., Perrone, M., Rader, D. J. 1999. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat. Genet*. 21., pp: 424-428

112. Jauhiainen, M., Metso, J., Pahlman, R., Blomqvist, S., van Tol, A., Ehnholm. 1993. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J. Biol. Chem.,* 268., pp: 4032-4036

113. Tu, A. Y., Nishida, H. I., Nishida, T. 1993. High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.,* 268., pp: 23098-23105

114. Jiang, X. C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O. L., Tall, A. R. 1999. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. J Clin Invest.,103., pp: 907-914

115. Durbin, D. M., Jonas, A. 1999. Lipid-free apolipoproteins A-I and A-II promote remodeling of reconstituted high density lipoproteins and alter their reactivity with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 2293-2302

116. Labeur, C., G. Lambert, T. Van Cauteren, N. Duverger, B. Vanloo, J. Chambaz, J. Vanderkerckhove, G. Castro, M. Rosseneu. 1998. Displacement of apoA-I from HDL by apoA-II or its C-terminal helix promotes the formation of pre-β1 migrating particles and decreases LCAT activation. *Atherosclerosis,* 139., pp: 351-362

117. Tall, A. 1993. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.,* 34., pp: 1255-1272

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

119. Rigotti, A., Trigatti, B., Babitt, J., Penman, M., Xu, S., Krieger, M. 1997. Scavenger receptor BI-a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipid.,* 8., pp: 181-188

120. Krieger, M. 1998. The 'best' of cholesterols, the 'worst' of cholesterols: a tale of two receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 95., pp: 4077-4080

121. Krieger, M. 1999. Charting the fate of the 'good cholesterol': identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.,* 68., pp: 523-558

122. Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M., Hobbs, H. H. 1996.

Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.,* 98., pp: 984-995

123. Lambert, G., Chase, M. B., Dugi, K., Bensadoun, A., Brewer H. B. Jr, Santamarina-Fojo, S. 1999. Hepatic lipase promotes the selective upatake of high-density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor BI. *J. Lipid Res*., 40., pp: 1294-1303

124. Collet X., Tall A.R, Serajuddin H., Guendouzi K., Royer L., Oliveira H., Barbaras R., Jiang X.C., Francone O.L. 1999. Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavemger receptor BI. *J. Lipid Res*., 40., pp: 1185-1193

125. Wang, N., Weng, W., Breslow, J. L., Tall, A. R. 1996. Scavenger receptor BI (SRBI) is upregulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores. In vivo evidence that SR-BI is a functional high density lipoprotein receptor under feedback control. *J. Biol. Chem.,* 271., pp: 21001-21004

126. Bruggen, D. V., Kalkman, I., van Gent, T., van Tol, A., Jansen, H. 1998. Induction of adrenal scavenger receptor BI and increased high density lipoportein-cholesteryl ether uptake by in vivo inhibition of hepatic lipase. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 32038-32041

127. Foger B., Chase M., Amar M. J., Vaisman, B. L., Shamburek, R. D., Paigen, B., Fruchart-Najib, J., Paiz, J. A., Koch, C. A., Hoyt, R. F., Brewer, H. B. Jr, Santamarina-Fojo, S. 1999. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J. Biol. Chem* 274: 36912-36920

128. Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E. I., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Krahe, R., Verroust, P. J., Moestrup, S. K. 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., pp: 656-661

129. Hammad, S. M., Stefanson, S., Twai, W. O., Drake, C. J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer H. B. Jr, 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., pp: 10158-10163

130. Moestrup, S. K., Kozyraki, R., Kristiansen, M., Kaysen, J. H., Rasmussen, H. H., Brault, D., Pontillon, F., Goda, F. O., Christensen, E. I., Hammond, T. G., Verroust, P. J. 1998. The intrinsic factor-vitamin B12 and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 5235-5242

131. Sahali, D., Mulliez, N., Chatelet, F., Laurent-Winter, C., Citadelle, D., Roux, C, Ronco, P., Verroust, P. 1992. Coexpression in humans by kidney and fetal envelopes of a 280 kDa-coated pit-restricted protein. *Am. J. Pathol*., 140., pp: 33-44

132. Moestrup, S. K., Kozyraki, R. 2000. Cubilin, a high density lipoprotein receptor. *Current Opin. Lipid.,* 11., pp: 133-140

133. Atkinson, D., Smith, H. M., Dickson, J., Austin, J. P. 1976. Interaction of apoprotein from porcine high-density lipoprotein with dimyristoyl lecithin. The structure of the complexes. *Eur. J. Biochem*., 64, pp: 541-547

134. Pownall, H. J., Massey, J. B., Kusserow, S. K., Gotto, A. M. Jr. 1978. Kinetics of lipid-protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high density lipoproteins with phosphatidylcholines. *Biochemistry.,* 17., pp: 1183-1188

135. Swaney, J. B. 1980. Properties of lipid-apolipoprotein association products. Complexes of dimyristoyl phosphatidylcholine and human apoA-I. *J. Biol. Chem.,* 255., pp: 877-881

136. Atkinson, D., Small, D. M. 1986. Recombinant lipoproteins: Implications for structure and assembly of native lipoproteins. *Ann. Rev. Biophys. Chem.,* 15, pp: 403-456

137. Jonas, A., Mason, W. R. 1981. Interactions of dipalmitoyl- and dimyristoyl phosphatidyl cholines and their mixtures with apolipoprotein A-I. *Biochemistry,* 20., pp: 3801-3805

138. Jonas, A. 1986. Reconstitution of high-density lipoproteins. *Methods Enzymol.,* 128., pp: 553-582

139. Matz, C. E., Jonas, A. 1982. Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J. Biol. Chem.,* 257., pp: 4535-4540

140. Jonas, A., Kezdy, K. E., Wald, J. H. 1989. Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. *J. Biol. Chem.,* 264., pp: 4818-4824

141. Norum, K. R., Glomset, J. A., Nichols, A. V., Forte, T., Albers, J. J., King, W. C., Mitchell, C. D., Applegate, K. R., Gong, E. L., Cabana, V. 1975. Plasma lipoproteins in

familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: effects of incubation with lecithin: cholesterol acyltransferase in vitro. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.,* 35 Suppl., 142., pp: 31-55

142. Glomset, J. A. 1962. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim. Biophys. Acta.,* 65., pp: 128-135

143. Jonas, A. 1987. Lecithin-cholesterol acyltransferase. In Plasma Lipoproteins. A. M. Gotto, editor. Elsevier Press, Amsterdam, pp: 299-333

144. McLean, J., Wion, K., Drayna, D., Fielding, C., Lawn, R. 1986. Human lecithin-cholesterol acyltransferase gene: complete gene sequence and sites of expression. *Nucleic Acids Res.,* 14., pp: 9397-9406

145. McLean, J., Fielding, C., Drayna, D., Dieplinger, H., Baer, B., Kohr, W., Henzel, W., Lawn, R. 1986. Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase c DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 83., pp: 2335-2339

146. Peelman, F., N. Vinaimont, A. Verhee, B. Vanloo, J -L. Verschelde, C. Labeur, S. Seguret-Mace, N. Duverger, G. Hutchinson, J. Vandekerckhove, J. Tavernier, M. Rosseneu. 1998. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Prot. Sci.,* 7., pp: 587-599

147. Peelman, F., Vanloo, B., Perez-Mendez, O., Decout, A., Verschelde, J. L., Labeur, C., et al. 1999. Characterization of functional residues in the interfacial recognition domain of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). *Protein Eng.,* 12., pp: 71-78

148. Jonas, A. 1998. Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *Prog. Lipid Res.,* 37., pp: 209-234

149. Jonas, A., Sweeny, S. A., Herbert, P. N. 1984. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.,* 259., pp: 6369-6375

150. Kuivenhoven, J. A., Pritchard, H., Hill, J., Frohlich, J., Assmann, G., Kastelein, G. 1997. The molecular pathology of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J. Lipid Res.,* 38., pp: 191-205

151. Pownall, H. J., Pao, Q., Massey, J. B. 1985. Acyl chain and headgroup specificity of human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase. Separation of matrix and molecular specificities. *J. Biol. Chem.,* 260., pp: 2146-2152

152. Rader, D. J., Ikewaki, K., Duverger, N., Schmidt, H., Pritchard, H., Frohlich, J., Clerc, M., Dumon, M. F., Fairwell, T., Zech, L. 1994. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing apoA-II in classic

lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease. *J. Clin. Invest., 93*., pp: 321-330

153. Jonas, A., Wald, J. H., Toohill, K. L. H., Krul, E. S., Kezdy, K. E. 1990. Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.,* 265., pp: 22123-22129

154. Sparks, D. L., Lund-Katz, S., Phillips, M. C. 1992. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.,* 267., pp: 25839-25847

155. Wong, L., Curtiss, L. K., Huang, J., Mann, C. J., Maldonado, B., Roheim, P. S. 1992. Altered epitope expresion of human interstitial fluid apolipoprotein A-I reduces its ability to activate lecithin cholesterol acyltransferase. *J. Clin. Invest.,* 90., pp: 2370-2375

156. Jin, L., Shieh, J. J., Grabbe, E., Adimoolam, S., Durbin, D., Jonas, A. 1999. Surface plasmon resonance biosensor studies of human wild-type and mutant lecithin cholesterol acyltransferase interactions with lipoproteins. *Biochemistry.,* 38., pp: 15659-15665

157. Adimoolam, S., Jin, L., Grabbe, E., Shieh, J. J., Jonas, A. 1998. Structural and functional properties of two mutants of lecithin-cholesterol acyltransferase (T123I and N228K). *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 32561-32567

158. Zorich, N., Jonas, A., Pownall, H. J. 1985. Activation of lecithin cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein E in discoidal complexes with lipids. *J. Biol. Chem.,* 260., pp: 8831-8837

159. Peelman, F., Verschelde, J. L., Vanloo, B., Ampe, C., Labeur, C., Tavernier, J., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. 1999. Effects of natural mutations in lecithin cholesterol acyltransferase on the enzyme structure and activity. *J. Lipid Res*., 40., pp: 59-69

160. Vanloo, B., Deschuimere, K., Peelman, F., Taveirne, J., Verhee, A., Gouyette, C., Labeur, C., Vandekerckhove, J., Tavernier, J., Rosseneu, M. 2000. Relationship between structure and biochemical phenotype of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) mutants causing fish-eye disease. *J. Lipid Res*., 41., pp: 752-761

161. Anantharamaiah, G. M., Venkatachalapathi, Y. V., Brouillette, C. G., Segrest, J. P. 1990. Use of synthetic peptide analogues to localize lecithin: cholesterol acyltransferase activating domain in apolipoprotein A-I. *Atheriosclerosis.,* 10., pp: 95-105

162. Anantharamaiah, G. M. 1986. Synthetic peptide analogs of apolipoproteins. *Methods Enzymol.,* 128., pp: 627-647

163. Banka, C. L., Bonnet, D. J., Black, A. S., Smith, R. S., Curtiss, L. K. 1991. Localization of an apolipoprotein A-I epitope critical for the activation of lecithin-cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.,* 266., pp: 23886-23892

164. Meng, Q. H., Calabresi, L., Fruchart, J. C., Marcel, Y. L. 1993. Apolipoprotein A-I domains involved in the activation of lecithin cholesterol acyltransferase. Importance of the central domain. *Biol. Chem*., 268., pp: 16966-16973

165. Minnich, A., Collet, X., Roghani, A., Cladaras, C., Hamilton, R. L., Fielding, C. J., Zannis, V. I. 1992. Site-directed mutagenesis and structure-function analysis of the human apoliprotein A-I. Relation between lecithin cholesterol acyltransferase activation and lipid binding. *J. Biol. Chem.,* 267., pp: 16553-16560

166. Sorci-Thomas, M., Kearns, M. W., Lee, J. P. 1993. Apolipoprotein A-I domains involved in lecithin-cholesterol acyltransferase activation. Structure-function relationships. *J. Biol. Chem*., 268., pp: 21403-21409

167. Matz, C. E., Jonas, A. 1982. Reaction of human lecithin cholesterol acyltransferase with synthetic micellar complexes of apolipoprotein A-I, phosphatidylcholine and cholesterol. *J. Biol. Chem*., 257., pp: 4541-4546

168. Sparrow, J. T., Gotto, A. M. 1980. Phospholipid binding studies with synthetic apolipoprotein fragments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* 348., pp: 187-211

169. Ji, Y., Jonas, A. 1995. Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins. *J. Biol. Chem*., 270., pp: 11290-11297

170. Sorci-Thomas, M. G., Curtiss, L., Parks, J. S., Thomas, M. J., Kearns, M. W. 1997. Alteration in apolipoprotein A-I 22-mer repeat order results in a decrease in lecithin:cholesterol acyltransferase reactivity. *J. Biol. Chem.,* 272., pp: 7278-7284

171. Sorci-Thomas, M. G., Curtiss, L., Parks, J. S., Thomas, M. J., Kearns, M. W., Landrum, M. 1998. The hydrophobic face orientation of apolipoprotein A-I amphipathic helix domain 6 143-164 regulates lecithin: cholesteryl acyltransferase activation. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 11776-11782

172. Dhoest, A., Z. Zhao, B. De Geest, E. Deridder, A. Sillen, Y. Engelborghs, D. Collen, P. Holvoet. 1997. Role of the Arg123-Tyr166 paired helix of apolipoprotein A-I in lecithin: cholesterol acyl transferase activation. *J. Biol. Chem.,* 272., pp: 15967-15972

173. Rall, S. C., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., Ogawa, Y., Fielding, C. J., Utermann, G. Haas, J., Steinmetz, A., Menzel, H. J., Assmann, G. 1984. Abnormal lecithin: cholesterol acyltransferase activation by a human apolipoprotein A-I variant in

which a single lysine residue is deleted. *J. Biol. Chem.,* 259., pp: 10063-10070

174. Daum, U. T. P. Leren, C. Langer, A. Chirazi, P. Cullen, P. Haydn Pritchard, G. Assmann, A. von Eckardstein. 1999. Multiple dysfunctions of two apoA-I variants apoA-I (R160L) Oslo and apoA-I (P165R) that are associated with hypoalphalipoproteinemia in heterozygous carriers. *J. Lipid Res*., 40., pp: 486-494

175. Utermann, G., Haas, J., Steinmetz, A., Paetzold, R., Rall, S. C., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. 1984. Apolipoprotein A-Igienssen (Pro143->Arg). A mutant that is defective in activating lecithin cholesterol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.,* 144., pp: 325-331

176. Verger, R., Mieras, M. C., Haas, G. H., 1973. Action of phospholipase A at interfaces. *J. Biol. Chem.,* 248., pp: 4023-4034

177. Stein, O., Stein, Y. 1973. The removal of cholesterol from Landschutz ascites cells by high-density apolipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta,* 326., pp: 232-244

178. Rothblat, G. H., Mahlberg, F. H., Johnson, W. J., Phillips, M. C. 1992. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J. Lipid Res.,* 33., pp: 1091-1097

179. Rothblat, G. H., Phillips, M. C. 1982. Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration. *J. Biol. Chem.,* 257., pp: 4775-4782

180. Phillips, M. C., Johnson, W. J., Rothblat, G. H. 1987. Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta,* 906., pp: 223-276

181. Johnson, W. J., Mahlberg, F. H., Rothblat, G. H., Phillips, M. C. 1991. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta,* 1085., pp: 273-298

182. Johnson, W. J., Bamberger, M. J., Latta, R. A., Rapp, P. E., Phillips, M. C., Rothblat, G. H. 1986. The bidirectional flux of cholesterol between cells and lipoproteins: effects of phospholipid depletion of high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.,* 261., pp: 5766-5776

183. Schroeder, F., Jefferson, J. R., Kier, A. B., Knittel, J., Scallen, T. J., Wood, W. G. Hapala, I. 1991. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 196., pp: 235-252.

184. Davidson, W. S., Gillotte, K. L., Lund-Katz, S., Johnson, W. J., Rothblat, G. H., Phillips, M. C. 1995. The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain

composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J. Biol. Chem*., 270., pp: 5882-5890

185. Zannis, V. I., Laccotrippe, M., Makrides, S. C., Kardassis, D., Znnia, E. E. 1996. Genetic factors contricuting to cardiovascular disease that may affect endothelial structure and function: the role of proteins involved in lipoprotein transport. In Vascular Endothelium, (Catravas D. editor), Plenum Press, New York, pp: 96-127

186. Fidge, N. H., Nestel, P. J. 1985. Identification of apolipoprotein involved in the interaction of human high density lipoprotein 3 with receptors on cultured cels. *J. Biol. Chem*., 260., pp: 3570-3575

187. Graham, D. L., Oram, J. F. 1987. Identification and chatacterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membranes by ligand blotting. *J. Biol. Chem*., 262., pp: 7439-7442

188. Tozuka, M., Fidge, N. 1989. Purification and characterization of two high density lipoprotein-binding in cell membranes by ligand blotting. *J. Biol. Chem*., 261., pp: 239-244

189. Barbaras, R., Puchois, P., Fruchart, J. C., Pradines-Figueres, A., Ailhaud, G. 1990. Purification of an apolipoprotein A binding protein from mouse adipose cells. *Biochem. J.,* 269., 767-773

190. Mendez, A. J., Oram, J. F., Bierman, E. L., 1991. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J. Biol. Chem*., 266., pp: 10104-10111

191. Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. L., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J. B., Tall, A. R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem*., 272., pp: 20982-20985

192. Llera-Moya, M., Rothblat, G. H., Connelly, M. A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S. W., Phillips, M. C., Williams, D. L. 1999. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 575-580

193. Rothblat, G. H., Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D. L., Phillips, M. C. 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 781-796

194. Schimtz, G., Robenek, H., Lohmann, U., Assmann, G. 1985. Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-loaded macrophares: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J.,* 4., pp: 613-622

195. Kambouris, A. M., Roach., P. D., Calvert, G. D., Nestel, P. J. 1990. Retroendocytosis of high density lipoproteins by the human hepatoma cell line, HepG2. *Atheriosclesrosis,* 10., pp: 582-590

196. Takahashi, Y., Smith, I. D. 1999. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-depedent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 96., pp: 11358-11363

197. Takahashi, K., Fukuda, S., Naido, M., Horiuchi, S., Takata, K., Morino, Y. 1989. Endocytic pathway of high density lipoprotein via trans-Golgi system in rat resident peritoneal macrophages. *Lab. Invest*., 61., pp: 270-277

198. Wyne, K. L., Woollett, L. A. 1998. Transport of maternal LDL and HDL to the fetal membranes and placenta of the golden Syrian hamster is mediated by receptor-dependent and receptor-independent processes. *J. Lipid Res.,* 39., pp: 518-530

199. Gilotte, K. L., Zaiou, M., Lund-Katz, S., Anantharamaiah, G. M., Holvoet, P., Dhoest, A., Palgunachari, M. N., Segrest, J. P., Weisgraber, K. H., Rothblat, G. H., Phillips, M. C. 1999. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsulibilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J. Biol. Chem.,* 274., pp: 2021-2128

200. Han, H., Sasaki, J., Matsunaga, A., Hakamata, H., Huang, W., Ageta, M**.,** Taguchi, T., Koga, T., Kugi, M., Horiuchi, S., Arakawa, K. 1999. A novel mutant, ApoA-I nichinan (Glu235->0), is associated with low HDL cholesterol levels and decreased cholesterol efflux fron cells. *Athrioscl. Thromb. Vasc. Biol.,* 19., pp: 1447-1455

201. Lindstedt, L., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Welgus, H., Kovanen, P.T. 1999. Matrix metalloproteinases-3, -7, and –12, but not –9, reduce high density lipoprotein-induced cholesterol efflux from human macrophage foam cells by truncation of the carboxyl terminus of apolipoprotein A-I. Parallel losses of pre-beta particles and the high affinity component of efflux. *J. Biol. Chem.* 274., pp: 22627-22634

202. Mendez, A. J., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., Oram, J. F. 1994. Synthetic peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol. *J. Clin. Invest.,* 94., pp: 1698-1705

203. Frank, P. G., D. N'Guyen, V. Franklin, T. Neville, M. Desforges, E. Rassart, D.L. Sparks, Y.L. Marcel. 1998. Importance of central α-helices of human apolipoprotein A-I in the maturation of high density lipoproteins. *Biochemistry,* 37., pp: 13902-13909

204. Francis, G.A., Knopp, R.H., Oram, J.F. 1995. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apoA-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.,* 96., pp: 78-87

205. Francis, G.A., Knopp, R.H., Oram, J.F. 1995. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apoA-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.,* 96., pp: 78-87

206. Makrides, S. C., Ruiz-Opazo, N., Hayden, M., Nussbaum, A. L., Breslow, J. L., Zannis, V. I. 1988. Sequence and expression of Tangier apoA-I gene. Eur. J. Biochem., 173., pp: 465-471

207. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., vanDam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, 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., Hayden, M. R., et al. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.,* 22., pp: 336-345

208. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik. W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., Schmitz, G. 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.,* 22., pp: 347-351

209. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Denefle, P., Assmann, G.1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet*., 22., pp: 352-355

210. Remaley, A. T., Rust, S., Rosier, M., Knapper, C., Naudin, L., Broccardo, C., Peterson, K. M., Koch, C., Arnould, I., Prades, C., Duverger, N., Funke, H., Assman, G., Dinger, M., Dean, M., Chimini, G., Santamarina-Fojo, S., Fredrickson, D. S., Denefle, P., Brewer, H. B. Jr. 1999. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* 96., pp: 12685-12690

211. Lawn, R. M., Wade, D. P., Garvin, M. R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J. G., Seilhamer, J. J., Vaughan, A. M., Oram, J. F.1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest.,* 104., R25-31

212. Luciani, M. F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M. G., Chimini, G. 1994. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics*, 21., pp: 150-159

213. Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M. F., Chimini, G.,

Kaminski, W. E., 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., pp: 29-33

214. Hayden, M. R., Clee, S. M., Brooks-Wilson, A., Genest, J. Jr., Attie, A., Kastlein, J. P. 2000. Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *J. Lipid Res.,* 11., pp: 117-122

215. Hara, H., Yokoyama, S. 1991. Interaction of free apoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J. Biol. Chem*., 266., pp: 3080-3086

216. Bielicki, J. K., Johnson, W. J., Weinberg, R. B., Glick, J. M., Rothblat, G. H. 1992. Efflux of lipid from fibroblasts to apolipoproteins: dependence on elevated levels of cellular unesterified cholesterol. J. Lip. Res., 33., pp: 1699-1709

217. Savion, N., Greemland, M., Kotev-Emeth, S., Thilo-Korner, D. G. 1991. Metabolism of cholesterol and phospholipids in cultured human vascular sooth muscle cells: differences between artery and vein-derived cells and the effect of oxygen partial pressure. *Eur. J. Cell Biol.,* 55., pp: 305-311

218. Savion, N., Kotev-Emeth, S. 1993. Role of apolipoproteins A-I, A-II, and C-I in cholesterol efflux from endothelial and smooth muscle cells. *Eur. Heart Journal.,* 14., pp: 930-935

219. Forte, T. M., Bielicki, J. K., Goth-Goldstein, R., Selmek, J., 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. Lip. Res.,* 36., pp: 148-157

220. Liang, J., Rye, K. A., Barter, P. J. 1994. The dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high-density lipoproteins. *J. Lip. Res.,* 35., pp: 1187-1199

221. von Eckardstein, A., Castro, G., Wbranska, I., Theret, N., Duchateaux, P., Duverger, N., Ailhaud, G., Assmann, G. 1993. Interaction of reconstituted high density lipoprotein discs containing human apolipoprotein A-I (ApoA-I) variants with murine adipocytes and macrophages. Evidensce for reduced cholesterol efflux promotion by apoA-I (Prop165→Arg). *J. Biol. Chem*., 268., pp: 2616-2622

222. von Eckardstein, A., Funke, H., Henke, A., Altland, K., Benninghoven, A., Assmann, G. 1989. Apolipoprotein A-I variants. Naturally occurring substitutions of proline residues affect plasma concentration of apolipoprotein A-I. *J. Clin. Invest.,* 84., pp: 1722-1730

223. Menzel, H. J., Assmann, G., Rall, S. C., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. 1984. Human apolipoprotein A-I polymorphism. Identification of amino acid substitutions in three electrophoretic variants of the Munster-3 type. *J. Biol. Chem.,* 269., pp: 3070-3076

224. Ladias, J. A., Kwiterovich, P. O., Smith, H. H., Karathanasis, S. K., Antonarakis, S. E. 1990. Apolipoprotein AI Baltimore (Arg->Leu), a new apoA-I variant. *Hum. Genet.,* 84., pp: 439-445

225. Takada, Y., Sasaki, J., Seki, M., Ogata, S., Teranishi, Y., Arakawa, K. 1991. Characterization of a new human apolipoprotein A-I Yame by direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *J. Lipid Res,.* 32., pp: 1275-1280

226. Nichols, W. C., Dwulet, F. E., Liepnieks, J., Benson, M. D. 1988. Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *BBRC.,* 156., pp: 762-768

227. Nichols, W. C., Gregg, R. E., Meng, M. S., Schaefer, J. R., Zech, L. A., Benson, M. D., Brewer, H. B. 1990. A mutation in apolipoprotein A-I in the Iowa type of familial amyloidotic polyneuropathy. *Genomics.,* 8., pp: 318-323

228. Ponsin, G., Gotto, A. M., Utermann, G., Pownall, H. J. 1985. Abnormal interaction of the human apolipoprotein A-I variant [Lys107→0] with high density lipoproteins. *BBRC*., 133., pp: 856-862

229. Jonas, A., von Eckardstein, A., Churgay, L., Mantulin, W. W., Assmann, G. 1993. Structural and functional properties of natural and chemical variants of apolipoprotein A-I. *Biochim. Biophys. Acta*., 1166., pp: 202-210

230. Takada, Y., Sasaki, J., Ogata, S., Nakanishi, T., Ikehara, Y., Arakawa, K. 1990. Isolation and characterization of human apolipoprotein A-I Fukuoka (110 Glu->Lys). A novel apolipoprotein variant. *Biochim. Biophys. Acta.,* 1043., pp: 169-176

231. Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., Weisgraber, K. H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res,.* 25., pp: 1277-1294

232. Weisgraber, K. H., Rall, S. C., Bersot, T. P., Mahley, R. W., Franceschini, G., Sirtori, R. 1983. Apolipoprotein A-Imilano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *J. Biol. Chem.,* 258., pp: 2508-2513

233. Weisgraber, K.H., Bersot, T.P., Mahley, R.W., Franceschini, G., Sirtori, C.R. 1980. A-I $_{milano}$ apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I from human high density lipoproteins. *J. Clin. Invest.,* 66., pp: 901-907

234. Franceschini, G., Sirtori, C. R., Bosisio, E., Gualandri, V., Orsini, G. B., Mogavero, A. M., Capurso, A. 1985. Relationship of the phenotypic expression of the A-I milano apoprotein with plasma lipid and lipoprotein patterns. *Atheriosclerosis.,* 58., pp: 159-174

235. Franceschini, G., Baio, M., Calabresi, L., Sirtori, C. R., Cheung, M. C. 1990. Apolipoprotein A-I milano. Partial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency due to low levels of a functional enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.,* 1043., pp: 1-6

236. Franceschini, G., Calabresi, L., Tosi, C., Sirtori, C. R., Fragiacomo, C., Noseda, G., Gong, E. L., Blanche, P. J., Nichols, A. V. 1987. Apolipoprotein A-I milano. Correlation between high density lipoprotein subclass distribution and hypertriglyceridemia. *Atheriosclerosis.,* 7., pp: 426-436

237. Roma, P., Gregg, R. E., Meng, M. S., Ronan, R., Zech, L. A., Franceschini, G., Sirtori, C. R., Brewer, H. B. 1993. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apoA-Imilano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *J. Clin. Invest.,* 91., pp: 1445-1452

238. Jabs, H. U., Assmann, G., Greifendorf, D., Benninghoven, A. 1986. High performance liquid chromatography and time-of-flight secondary ion mass spectroscopy: a new dimension in structural analysis of apolipoproteins. *J. Lipid Res,.* 27., pp: 613-621

239. Strobl, W., Jabs, H. U., Hayde, M., Holzinger, T., Assmann, G., Widhalm, K. 1988. Apolipoprotein A-I (Glu198->Lys): a mutant of the major apolipoprotein of high density lipoproteins occurring in a family with dyslipoproteinemia. *Pediatr. Res.,* 24., pp: 222-228

240. Matsunaga, T., Hiasa, Y., Yanagi, H., Maeda, T., Hattori, N. Yamakawa, K., Yamanouchi, Y., Tanaka, I., Obara, T., Hamaguchi. 1991. Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 88., pp: 2793-2797

241. Funke, H., von Eckardstein, A., Pritchard, P. H., Karas, M., Albers, J. J., Assmann, G. 1991. A frameshift mutation in the human apolipoprotein A-I gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin: cholesterol-acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *J. Clin. Invest*., 87., pp: 371-376

242. 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., Brewer, J. 1985. Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency, variant II. *J. Lipid Res,.* 26., pp: 1089-1101

243. Ordovas, J. M., Kassidy, D. K., Civeira, F., Bisgaier, C. L., Schaefer, E. J. 1989. Familial apolipoprotein A-I, C-III, and apoA-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J. Biol. Chem.,* 264., pp: 16339-16342

244. Karathanasis, S. K., Norum, R. A., Zannis, V. I., Breslow, J. L. 1983. An inherited polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene locus related to the development of atherosclerosis. *Nature.,* 301., pp: 718-720

245. Walsh, A., Ito, Y., Breslow, J. L. 1989. High levels of human apolipoportein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoportein (HDL) particles comparable to human HDL3. *J. Biol. Chem.,* 264., pp: 6488-6494

246. Rubin, E. M., Ishida, B. Y., Clift, S. M., Krauss, R. M. 1991. Expression of human apolipoprotein A-I in transgenic mice results in reduced plasma levels of murine apolipoprotein A-I and the appearance of two new high density lipoprotein size subcalsses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 88., pp: 434-438

247. Paszty, M., Maeda, N., Verstuyft, J., Rubin, E. M. 1994. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.,* 94., pp: 899-903

248. Emmanuel, F., Caillaud, J. M., Heennuyer, N., Fievet, C., Viry, I., Houdebine, L. M., Fruchart, J. C., Denefle, P., Duvenger, N. 1996. Overexpression of human apolipoprotein A-I inhibits atherosclerosis development in Watanable rabbits. *Circulation*, 94., I-632 (3692)

249. Forte, T., McCall, M. R. 1994. The role of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipid.,* 5., pp: 354-364

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

251. Parks, J. S., Li, H., Gebre, A. K., Smith, T. L., Maeda, N. 1995. Effect of apolipoprotein A-I deficiency only on lecithin: cholesterol activation in mouse plasma. *J. Lipid Res.,* 36., pp: 3349-355

252. Mechior, G. W., Castle, C. K., Murray, R. W., Blake, W. L., Dinh, D. M., Marotti, K. R. 1994. Apolipoprotein A-I metabolism in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. Insights into the mechanisms responible for low plasma high density lipoprotein levels. *J. Biol. Chem.,* 269., pp: 8044-8051

253. Francone, O. L., Royer, L., Haghpassand, M. 1996. Increased pre-beta HDL levels, cholesterol efflux, and mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J. Lipid Res.,* 37., pp: 1268-1277

254. Mehlum, A., Staels, B., Duverger, N., Tailleux, A., Castro, G., Fievet, C. Luc, G., Fruchart, J. C., Olivecrona, G., Skretting, G., et al. 1995. Tissue-specific expression of the human gene for lecithin: cholesterol acyltransferase in transgenic mice alters blood lipids, lipoproteins and lipases towards a less atherogenic profile. *Eur. J. Biochem*., 230., pp: 567-575

255. Brousseau, M. E., Hoeg, J. M. 1999. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 365-375

256. Berard, A. M., Foger, B., Remaley, A., Shamburek, R., Vaisman, B. L., Talley, G., Paigen, B., Hoyt, R. F. Jr, Marcovina, S., Brewer, H. B. Jr., Santamarina-Fojo, S. 1997. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin: cholesteryl acyltransferase. *Nat. Med.,* 3., pp: 744-749

257. Amar, M. J. A., Shamburek, R. D., Foger, B., Hoyt Jr, R. F., Wood, D. O., Santamarina-Fojo, S., Brewer Jr, 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., I-35.

258. Hoeg, J. M., Santamarina, F. S., Berard, A. M., Cornhill, J. F., Herderick, E. E., Feldman, S. H., et al. 1996. Overexpression of lecithin: cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 93., pp: 11448-11453

259. Foger, B., Vaisman, B. L., Paigen, B., Hoyt Jr, R. F., Brewer Jr, H. B., Santamarina-Fojo, S. 1997. CETP modulates the development of aortic atherosclerosis in LCAT-transgenic mice. *Circulation*, 96., I-110.

260. Sakai, N., Vaisman, B. L., Koch, C. A., Hoyt, R. F. Jr., Meyn, S. M., Talley, G. D., Paiz, J. A., Brewer, H. B. Jr, Santamarina-Fojo, S. 1997. Targeted disruption of the mouse lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) gene. Generation of a new animal model for human LCAT deficiency. *J. Biol. Chem.,* 272., pp: 7506-7510

261. Albers, J. J., Pitman, W., Wolfbauer, G., Cheung, M. C., Kennedy, H., Tu, A. Y., Marcivona, S. M., Paigen, B. 1999. Relationship between phospholipid transfer

protein activity and HDL level and size among inbred mouse strains. *J. Lipid. Res.,* 40., pp: 295- 301

262. Pussinen, P. J., M. Jauhiainen, J. Metso, L. E. Pyle, Y. L. Marcel, N. H. Fidge, C. Ehnholm. 1998. Binding of phospholipid transfer protein (PLTP) to apolipoproteins and A- II: Location of a PLTP binding domain in the amino terminal region of apoA-I. *J. Lipid Res.,* 39., pp: 152-161

263. Dichek, H. L., Brecht, W., Fan, J., Ji, Z. S., McCormick, S. P., Akeefe, H., Conzo, L., Sanan, D. A., Weisgraber, K. H., Young, S. G., Taylor, J. M., Mahley, R. W. 1998. Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B-containing and high density lipoproteins. Evidence that hepatic lipase acts as a ligand for lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem*., 273., pp: 1896-1903

264. Homanics, G. E., de Silva, H. V., Osada, J., Zhang, S. H., Wong, H., Borensztajn, J., Maeda, N. 1995. Mild dyslipidemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. *J. Biol. Chem*., 270., pp: 2974-2980

265. Bergeron N., Kotite L., Verges M., Blanche P.., Hamilton R.L, Krauss R.M. Bensadoun A. Havel R.J. 1998. Lamellar lipoproteins uniquely contribute to hyperlipidemia in mice doubly deficient in apoE and hepatic lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*., 95., pp: 15647-15652

266. Krieger, M., Herz, J. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.,* 63., pp: 601-637

267. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., Brown, M. S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,*76., pp: 333-337

268. Krieger, M. 1992. Molecular flypaper and atherosclerosis: structure of the macrophage scavenger receptor. *Trends Biochem. Sci.,* 17., pp: 141-146

269. Fogelman, A. M., Van Lenten, B. J., Warden, C., Haberland, M. E., Edwards, P. A. 1988. Macrophage lipoprotein receptors. *J. Cell. Sci. Suppl.,* 9., pp: 135-149

270. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., et al. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386., pp: 292-296

271. Krieger, M., Acton, S., Ashkenas, J., Pearson, A., Penman, M., Resnick, D. 1993. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J. Biol. Chem.,* 268., pp: 4569-4572

272. Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K., Anderson, R. G. 1979. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell. Biol*., 82., pp: 597-613

273. Sparrow, C. P., Parthasarathy, S., Steinberg, D. 1989. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.,* 264., pp: 2599-2604

274. Arai, H., Kita, T., Yokode, M., Narumiya, S., Kawai, C. 1989. Multiple receptors for modified low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages: different uptake mechanisms for acetylated and oxidized low density lipoproteins. *BBRC*., 159., pp: 1375-1382

275. Van Berkel, T. J., De Rijke, Y. B., Kruijt, J. K. 1991. Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J. Biol. Chem.,* 266., pp: 2282-2289

276. Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P., Krieger, M. 1990. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature,* 343., pp: 531-535

277. Rohrer, L., Freeman, M., Kodama, T., Penman, M., Krieger, M. 1990. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature*, 343., pp: 570-572

278. Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., Seed, B. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell*., 58., pp: 95-101

279. Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F., Krieger, M. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.,* 269., pp: 21003-21009

280. Pearson, A., Lux, A., Krieger, M. 1995. Expresion cloning of d SR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 92., pp: 4056-4060

281. Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G., Tryggvason, K. 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell,*

80., pp: 603-609

282. Freeman, M., Ashkenas, J., Rees, D. J., Kingsley, D. M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Krieger, M. 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 87., pp: 8810-8814

283. Matsumoto, A., Naito, M., Itakura, H., Ikemoto, S., Asaoka, H., Hayakawa, I., Knamori, H., Aburatani, H., Takaku, F., Suzuki, H., et al. 1990. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 87., pp: 9133-9137

284. Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M., Ratz, C. R. H. 1991. Recognition and plasma clearence of endotoxin by scavenger receptors. *Nature,* 352., pp: 342-344

285. Grennberg, J. W., Fischer, W., Joiner, K. A. 1996. Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor. *Infect. Immun*., 64., pp: 3318-3325

286. Krieger, M. 1997. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. Curr. Opin. Lipidol., 8., pp: 275-280

287. Levine, D. M., Parker, T. S., Donnelly, T. M., Walsh, A., Rubin, A. L. 1993. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 90., pp: 12040-12044

288. Sibbaild, W. J., Short, A., Cohen, M. P., Wilson, R. F. 1977. Variations in adrenocortical responsiveness during severe bacterial infections: unrecognized adrenocortical insufficiency in severe bacterial infections. *Ann. Surg.,* 186., pp: 29-33

289. Schnitzer, J. E., Bravo, J. 1993. High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins: potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors. *J. Biol. Chem*., 268., pp: 7562-7570

290. Sambrano, G. R., Steiberg, D. 1995. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 92., pp: 1396-1400

291. Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J., Savill, J. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.,* 181., pp: 1857-1862

292. Fukasawa, M., Adachi, H., Hirota, K., Tsusimoto, M., Akai, H., Inoue, K., 1996. SR-BI, a class B scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells. *Exp. Cell. Res*., 222., pp: 246-250

293. Rigotti, A., Acton, S. L., Krieger, M. 1995. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J. Biol. Chem*., 270., pp: 16221-16224

294. Ryeom, S. W., Sparrow, J. R., Silverstein, R. L. 1996. CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J. Cell. Sci*., 109., pp: 387-395

295. Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., Protter, A. A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem*., 268., pp: 11811-11816

296. Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N., Jamieson, G. A. 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood.,* 80., pp: 1105-1115

297. Parton, R. G. 1996. Caveolae and caveolins. *Curr. Opin. Cell. Biol.,* 8., pp: 542-548

298. Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslett, C. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest*., 90., pp: 1513-1522

299. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., Silverstein, R. L. 2000. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest*.,105., pp: 1049-1056

300. Kozarsky, K. F., Dohanee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R., Krieger, M. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature,* 387., pp: 414-417

301. Arai, T., Wang, N., Bezouevski, M., Welch, C., Tall A. R. 1999. Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J. Biol. Chem*., 274., pp: 2366-2371

302. Sehayek, E., Ono, J. G., Shefer, S., Nguyen, L. B., Wang, N., Batta, A. K., Salen G., Smith J. D., Tall, A. R., Breslow, J.L. 1998. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 95., pp: 10194-10199

303. Ueda, Y., Royer, L., Gong, E., Zhang, J., Cooper, P. N., Francone, O., Rubin, E. M. 1999. Lower plasma levels and accelerated clearence of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B, type I transgenic mice. *J. Biol. Chem.,* 274., pp: 7165-7171

304. Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., Tall, A. R. 1998. Liver specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein apoB, low density lipoprotein apoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 32920-32926

305. Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., Krieger, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I revels its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 94., pp: 12610-12615

306. Trigatti, B., Rayburn, H., Vinals, M., Braun, A., Miettinen, H., Penman, M., Hertz, M., Schrenzel, M., Amigo, L., Rigotti, A., Krieger, M. 1999. Influence of the HDL receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci.. USA.,* 96., pp: 9322-9327

307. Swarnakar, S., Temal, R. E., Connelly, M. A., Azhar, S., Williams, D. L. 1999. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem*., 274., pp: 29733-29739

308. Stangl, H., Hyatt, M., Hobbs, H. H. 1999. Transport of lipids from high and low density lipoproteins via scavenger receptor-BI. *J. Biol. Chem*., 274., pp: 32692-32698

309. Brown, M. S., Goldstein, J. L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science,* 232., pp: 34-47

310. Calvo, D., Vega, M. A. 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J. Biol. Chem*., 268., pp: 18929-18935

311. Cao, G., Garcia, C. K., Wyne, K. L., Schultz, R. A., Parker, K. L., Hobbs, H. H. 1997. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J. Biol. Chem.,* 272., pp: 33068-33076

312. Welch, C. L., Xia, Y. R., Gu, L. J., Machleder, D., Mehrabian, M., Wen, P. Z., Webb, N., de Villiers, W. J., van der Westhuyzen, D., Lusis, A. J. 1997. SRB1 maps to mouse chromosome 5 in a region harboring putative QTLs for plasma lipoprotein levels. *Mamm. Genome*., 8., pp: 942-944

313. Lopez, D., McLean, M. P. 1999. Sterol regulatory element-binding protein-1a

binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology*, 140., pp: 5669-5681

314. Trigatti, B., Rigotti, A., Krieger, M. 2000. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipid*., 11., pp: 123-131

315. Cao, G., Zhao, L., Stangl, H., Hasegawa, T., Richardson, J. A., Parker, K. L., Hobbs, H. H. 1999. Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type I. *Mol. Endocrin*., 13., pp: 1460-1473

316. Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K. G. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 28545-28548

317. Sun, Y., Wang, N., Tall, A. R. 1999. Regulation of adrenal scavenger receptor-BI expression by ACTH and cellular cholesterol pools. J. Lipid Res., 40., pp: 1799-1805

318. Chinette, G., Gbaguidi, F. G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., et al. 2000. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation*, in press.

319. Fluiter, K., van der Westhuijzen, D. R., van Berkel, T. J. 1998. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selctive uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J. Biol. Chem*., 273., pp: 8434-8438

320. Tao, N., Wagner, S. J., Lublin, D. M. 1996. CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J. Biol. Chem.,* 271., pp: 22315-22320

321. Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G., Xu, S., Krieger, M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipiduptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem*., 272., pp: 13242-13249

322. Pearce, S. F., Wu, J., Silverstein, R. L. 1994. A carboxyl terminal truncation mutant of CD36 is secreted and binds thrombospondin: evidence for a single transmembrane domain. *Blood,* 84., pp: 384-389

323. Harder, T., Simons, K. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell. Biol.,* 9., pp: 534-542

324. Webb, N. R., de Villiers, W. J., Connell, P. M., de Beer, F. C., van der Westhuyzen, D. R. 1997. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J. Lipid Res*., 38., pp: 1490-1495

325. Webb, N. R., Connell, P. M., Graf, G. A., Smart, E. J., de Villiers, W. J., de Beer, F. C., van der Westhuyzen, D. R. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 15241-15248

326. Gu, X., Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J., Krieger, M. 1998. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 26338-26348

327. Brissette, L., Falstrault, L. 1994. Analysis of the selective uptake of the cholesteryl ester of human intermediate density lipoproteins by HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta.,* 1213., pp: 5-13

328. Connelly, M. A., Klein, S. M., Azhar, S., Abumrad, N. A., Williams, D. L. 1999. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receprors mediate high density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteyl ester uptake. *J. Biol. Chem*., 274., pp: 41-47

329. Steinberg, D. 1996. A docking receptor for HDL cholesterol esters. *Science,* 271., pp: 460-461

330. Rader, D. J., Ikewaki, K. 1996. Unravelling high density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animal models. *Curr. Opin*. *Lipidol.,* 7., pp: 117-123

331. Rodrigueza, W. V., Thuahnai, S. T., Temel, R. E., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Williams, D. L. 1999. Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J. Biol. Chem*., 274., pp: 20344-20350

332. Graf, G. A., Connell, P. M., van der Westhhuyzen, D. R., Smart, E. J. 1999. The class B, type I, scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae. *J. Biol. Chem.,* 274., pp: 12043-12048

333. Matveev, S., van der Westhhuyzen, D. R., Smart, E. J. 1999. Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *J. Lipid Res*., 40., pp: 1647-1654

334. Stangl, H., Cao, G., Wyne, K. L., Hobbs, H. H. 1998. Scavenger receptor, class B, type I-dependent stimulation of cholesterol esterification by high density lipoproteins,

low density lipoproteins, and nonlipoprotein cholesterol. *J. Biol. Chem.,* 273., pp: 31002-31008

335. Fielding, P. E., Fielding, C. J. 1995. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry,* 34., pp: 14288-14292

336. Jian, B., de la Llera-Moya, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M. C., Swaney, J. B., et al. 1998. Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol. Chem.,* 273., pp: 5599-5606

337. Llera-Moya, M., Rothblat, G. H., Connelly, M. A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S. W., Phillips, M. C., Williams, D. L. 1999. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 575-580

338. Hatzopoulos, A. K., Rigotti, A., Rosenberg, R. D., Krieger, M. 1998. Temporal and spatial pattern of exression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis. *J. Lipid Res.,* 39., pp: 495-508

339. Rigotti, A., Edelman, E. R., Seifert, P., Iqbal, S. N., DeMattos, R. B., Temel, R. E., Krieger, M., Williams, D. L. 1996. Regulation by adrenocorticotropic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J. Biol. Chem.,* 271., pp: 33545-33549

340. Liu, J., Voutilainen, R., Heikkila, P., Kahri, A. I. 1997. Ribonucleic acid expression of the CLA-1 gene, a human homolog to mouse high density lipoprotein receptor SR-BI, in human adrenal tumors and cultured adrenal cells. J. Clin. Endocrinol. Metab., 82., pp: 2522-2527

341. Martin, G., Pilon, A., Albert, C., Valle, M., Hum, D. W., Fruchart, J. C., et al. 1999. Comparison of expression and regulation of the high density lipoprotein receptor SR-BI and the low density lipoprotein receptor in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells. *Eur. J. Biochem.,* 261., pp: 481-491

342. Imachi, H., Murao, K., Sato, M., Hosokawa, H., Ishida, T., Takahara, J. 1999. CD36 LIMPII analogous-1, a human homolog of the rodent scavenger receptor B1, provides the choletserol ester for steroidogenesis in adrenocortical cells. *Metabolism,* 48., pp: 627-630

343. Temel, R. E., Trigatti, B., DeMattos, R. B., Azhar, S., Krieger, M., Williams, D. L. 1997. Scavenger receptor class B, type I, (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse

adrenocortical cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 94., pp: 13600-13605

344. Li, X., Peegel, H., Menon, K. M. 1998. In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for m RNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. *Endocrinology*, 139., pp: 3043-3049

345. Reaven, E., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., Temel, R., Williams, D. L., Azhar, S. 1998. Expression and microvillar localization of scavenger receptor, class B, type I (a high density lipoprotein receptor) in luteinized and hormone-desensitized rat ovarian models. *Endocrinology*, 139., pp: 2847-2856

346. Azhar, S., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., Reaven, E. 1998. Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J. Lipid Res.,* 39., pp: 1616-1628

347. Shiratsuchi, A., Kawasaki, Y., Ikemoto, M., Arai, H., Nakanishi, Y. 1999. Role of class B scavenger recptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J. Biol. Chem*., 274., pp: 5901-5908

348. Woollett, L. A., Kearney, D. M., Spady, D. K. 1997. Diet modification alters plasma HDL cholesterol concentrations but not the transport of HDL cholesteryl esters to the liver in the hamster. *J. Lipid Res.,* 38., pp: 2289-2302

349. Spady, D. K., Woollett, L. A., Meidell, R. S., Hobbs, H. H. 1998. Kinetic characteristics and regulation of HDL cholesteryl ester and apolipoprotein transport in the apoA-I -/- mouse. *J. Lipid Res.,* 39., pp: 1483-1492

350. Spady, D. K., Kearney, D. M., Hobbs, H. H. 1999. Polunsaturated fatty acids up-regulate hepaic scavenger receptor BI (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J. Lipid Res.,* 40., pp: 1384-1394

351. Varban, M. L., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Gosselin, M. L., Dixon, K. L., Deeds, J. D., Acton, S. L., Tall, A. R., Huszar, D. 1998. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95., pp: 4619-4624

352. Ji, Y., Wang, N., Ramakrishnan, R., Sehayek, E., Huszar, D., Breslow, J.L., Tall, A. R. 1999. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearence of high dnesity lipoprotein free cholesterol and its transort into bile. *J. Biol. Chem*., 274., pp: 33398-33402

353. Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A., Vega, M. A. 1997. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,* 17., pp: 2341-2349

354. Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Glick, J. M., Krieger, M., Rader, D., J. 2000. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Atheroscl. Thrombos. Vasc. Biol.,* 20., pp: 721-727

355. Hirano, K., Yamashita, S., Nakagawa, Y., Ohya, T., Matsuura, F., Tsukamoto, K., et al. 1999. Expression of human scavenger receptor class B, type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ. Res.,* 85., pp: 108-116

356. Zannis, V. I. 1986. Genetic polymorphism in human apolipoprotein E. In: *Methods in Enzymology* (J. P. Segrest, J. J. Albers, eds). Academic Press Inc. 128, pp: 690-712

357. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory.

358. Whittaker, E. L. 1987. From genes to clones: Introduction to gene technology (M. G. Weller, editor). Weinheim, VCH Publishers, pp: 108-110

359. Kirby, K. S. 1956. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J*., 64, 405

360. Wang, Z., Rossman, T. R. 1994. Isolation of DNA fragments from agarose gel by centrifugation. *Nucl. Acids Res*., Vol 22, No. 14, pp: 2862-2863

361. Sanger, F., Micklen, S., Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 74, pp: 5463

362. Graham, F., Van der Eb, A. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 57, pp: 456-467

363. O'Farrel, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem*., Vol 250, No. 10, pp: 4007-4021

364. Batsch, J. R., Patsch, W. 1986. Zonal ultracentrifugation. *Meth. Enzymol.,* 129., pp: 3-25

365. Goldstein, J. L., Basu, S. K., Brown, M. S. 1983. Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells. *Meth. Enzymol.,* 98., pp: 241-260

366. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, J. R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* 193., pp: 265-275

367. Acton, S. L., Resnick, D., Freeman, M., Ekkel, L., Ashkenas, J., Krieger, M.1993. The collagenous domains of macrophage scavenger receptors and complement C1q mediate similar, but not identical, binding specificities for polyanionic ligands. *J. Biol. Chem.,* 268., pp: 3530-3537

368. Krieger, M. 1983. Complementation of mutations in the LDL pathway of receptor-mediated endocytosis by co-cultivation of LDL receptor-defective hamster cell mutants. *Cell.,* 33., pp:413-422

369. Roghani, A., 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., pp: 7428-7435

370. Cladaras, C., Cladaras-Hatzopoulou, M., Felber, B., Pavlakis, G., Zannis, V. I. 1987. The molecular basis of a familial apoE deficiency: an acceptor splice site mutation in the third intron of the deficient apoE gene. *J. Biol. Chem.,* 262., pp: 2310-2315

371. Formasino, S., Brewer, H. B., Osborne, J. C. 1978. Effect of pressure and ionic strength on the self-association of ApoA-I from the human high-density lipoprotein complex. *J. Biol. Chem.,* 253, pp: 354-359

372. Stone, W. L., Reynolds, J. A. 1975. The self-association of the apo-Gln-I and apo-Gln-II polypeptides of human high density serum lipoproteins. *J. Biol. Chem*., 250., pp: 8045-8048

373. Swaney, J. B., O'Brien, K. 1978. Cross-linking studies of the self-association properties of apoA-I and apoA-II from human high density lipoprotein. *J. Biol. Chem*., 253., pp: 7069-7077

374. Cleland, W. W. 1979. Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Methods Enzymol*., 63., pp: 103-138

375. Marcel, Y. L., Provost, P. R., Koa, H., Raffai, E., Dac, N. V., Fruchart, J. C. Rassart, E. 1991. The epitopes of apolipoprotein A-I define dinstinct structural domains including a mobile middle region. *J. Biol. Chem*., 266., pp: 3644-3653

376. Gorshkova, I. N., Liadaki, K. N., Gursky, O., Atkinson, D., Zannis, V. I. 2000. Probing the lipid-free structure and stability of apolipoprotein A-I by mutations. *Biochemistry*, IN PRESS.

377. Kunitake, S. T., Chi Chen, G., Kung, S. F., Schilling, J. W., Hardman, D. A., Kane, J. P. 1990. Pre-β high density lipoprotein: Unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis. *Arteriosclerosis,* 10., pp: 25-30

378. Brinton, E. A., Eisenberg, S., Breslow, J. L. 1994. Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution. *Atherosclerosis Thrombosis*, 14., pp: 707-720

379. Thuahnai, S. T., Segall, M. L., Lund-Katz, S., Morrow, J., Weisgraber, K. H., Phillips, M. C. 1999. Lipid-induced conformational changes in apolipoproteins are required for high affinity binding to scavenger receptor SR-BI. *Suppl. to Circulation* –186 (I-37)