ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ & ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ HDL, SR-BI ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ IN VITRO

ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΜΠΑΝΑΚΟΣ

ΜΑΪΟΣ 2008

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Βασίλειος Ι. Ζαννής (επιβλέπων)
Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Δημήτριος Καρδάσης (μέλος τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης)
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Ιάννης Ταλιανίδης (μέλος τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης)
Ερευνητής Α' και Διευθυντής, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλ. Φλέμινγκ»
Δημήτριος Μπούμπας
Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Αριστείδης Ηλιόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Βενετία Ζαχαρίου
Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δρ. Βασίλειο Ζαννή, που μέσω του προσωπικού του μόχθου, έδωσε την ευκαιρία σε εμένα, όπως και σε άλλους φοιτητές του, να υπηρετήσουμε την Επιστήμη μας σε υψηλότατο επίπεδο.

Ευχαριστώ επίσης τον συν-επιβλέποντα Καθηγητή μου Δρ. Monty Krieger, ο οποίος υπήρξε και παραμένει πρότυπο Επιστήμονα και Ανθρώπου.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη των δύο εργαστηρίων όπου εκπόνησα τη διατριβή μου για όλη τη βοήθεια που μου παρείχαν. Από το εργαστήριο του Καθ. Βασίλη Ζαννή τους Κώστα Δροσάτο, Ιορδάνη Καραγιαννίδη, Γιώργο Κούκο, Κυριάκο Κυπρέο, Tong Liu, Κυριακή Μπακιρτζή, Anne Plunkett, Adela Shkodrani, Gayle Forbes και Αγγέλικα Χρόνη και από το εργαστήριο του Καθ. Monty Krieger τους Sara Fenske, Sharon Karackattu, Nianya Liu, Thomas Nieland, Marsha Penman, Eyal Reinstein, Kathy Sweeney, Eliza Vasile, Sara Vassallo, Shangzhe Xu, Ayce Yesilaltay, Songwen Zhang και Yu Zhu.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο SR-BI (Scavenger receptor class B type I) είναι ο λειτουργικός υποδοχέας των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (High Density Lipoprotein, HDL), του οποίου η τρισδιάστατη δομή είναι άγνωστη. Βασικός στόχος της διατριβής μου ήταν η παραγωγή ικανής ποσότητας ομοιογενώς τροποποιημένης, καθαρής πρωτεΐνης SR-BI, κατάλληλης για μελέτες κρυστάλλωσης. Μακροπρόθεσμος στόχος είναι η συσχέτιση της τρισδιάστατης δομής του υποδοχέα, με τις γνωστές του λειτουργίες, όσον αφορά στην επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων και στην κυτταρική έξοδο ελεύθερης χοληστερόλης.

Προκειμένου να παραχθούν μεγάλες ποσότητες SR-BI με ομοιογενή γλυκοζυλίωση, ο υποδοχέας εκφράστηκε σε μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά HEK (Human Embryonic Kidney), με χρήση ενός συστήματος επαγώμενης έκφρασης μέσω της προσθήκης τετρακυκλίνης. Η επαγώμενη έκφραση του SR-BI σε κυτταρικές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα, παρέκαμψε το πρόβλημα της κυτταρικής συσσωμάτωσης και αύξησε την έκφραση της πρωτεΐνης. Η κυτταρική σειρά HEK που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του SR-BI είναι μεταλλαγμένη ως προς το γονίδιο GnTI (N-acetyl Glucosaminyl Transferase I). Αυτή η μετάλλαξη οδήγησε σε ομοιόμορφη γλυκοζυλίωση του SR-BI με ολιγοσακχαρίτες υψηλής μανόζης $GlcNAc(Man)_5$. Οι ιδιότητες γλυκοζυλίωσης του SR-BI πιστοποιήθηκαν μετά από πέψη με τα ένζυμα ενδογλυκοζιδάση Η (Endoglycosidase H, EndoH) και Ν-γλυκοζιδάση F (N-Glycosidase F, PNGase F). Η Ν-γλυκοζιδάση F πέπτει υψηλής μανόζης, καθώς και σύμπλοκες γλυκάνες. Η ενδογλυκοζιδάση Η πέπτει μόνο υψηλής μανόζης γλυκάνες. Ανάλυση κατά Western που ακολούθησε τις πέψεις επιβεβαίωσε την παραγωγή του SR-BI με τον αναμενόμενο βαθμό γλυκοζυλίωσης (μοριακή μάζα ~54kDa). Ο SR-BI που παρήχθη σε μικρή κλίμακα σε κυτταροκαλλιέργειες, απομονώθηκε με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας από το κυτταρικό εκχύλισμα, με χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης συνεζευγμένων με το μονοκλωνικό αντίσωμα 1D4. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει τον επίτοπο t1, ένα εννεαπεπτίδιο (TETSQVAPA) που αντιστοιχεί στα εννέα καρβοξυτερματικά αμινοξέα της πρωτεΐνης ροδοψίνης. Ο επίτοπος t1 ενσωματώθηκε στο καρβοξυτερματικό άκρο του SR-BI με γενετική μηχανική. Ο προσδεδεμένος SR-BI

εκλούσθηκε με προσθήκη περίσσειας πεπτιδίου t1 και ανιχνεύθηκε με SDS-PAGE, ανάλυση κατά Western και με χρώση αργύρου. Προκειμένου να πραγματοποιηθούν μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες της μεταλλαγμένης κυτταρικής σειράς (HEK293SGnTI⁻ TetR), χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας CELLIGEN PLUS, στον οποίον η θερμοκρασία, η τιμή του pH, καθώς και το περιεχόμενο της καλλιέργειας σε οξυγόνο, άζωτο, διοξείδιο του άνθρακος και αέρα, ελέγχεται ηλεκτρονικά. Η κυτταρική πυκνότητα που επετεύχθη στο βιοαντιδραστήρα ήταν περίπου 5 X 10^6 κύτταρα / ml (ολικός όγκος καλλιέργειας 5.5L). Χρησιμοποιώντας μεγάλης κλίμακας χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας, παρήχθησαν περίπου 5-8 χιλιοστογραμμάρια καθαρής πρωτεΐνης ανά 5.5 λίτρα καλλιέργειας. Μέρος της απομονωμένης πρωτεΐνης ενσωματώθηκε σε λιποσώματα αποτελούμενα από χοληστερόλη και φωσφατιδυλχολίνη (και σε κάποιες περιπτώσεις, σφιγγομυελίνη), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε μια δοκιμασία πρόσδεσης σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης. Αυτή η δοκιμασία επέτρεψε τον υπολογισμό της ποσότητας των λιποπρωτεϊνών που προσδένονται στα πρωτεολιποσώματα και των αιθέρων χοληστερόλης που προσλαμβάνονται από αυτά, μέσω του SR-BI. Αυτές οι αναλύσεις έδειξαν ότι ο απομονωμένος και μεταλλαγμένος ως προς τη γλυκοζυλίωσή του, SR-BI, είναι λειτουργικός και ότι προσδένει ^{125}I-HDL και προσλαμβάνει αιθέρες χοληστερόλης από την [^{3}H]-CE-HDL σε επίπεδα παρόμοια με τον αγρίου τύπου mSR-BI-t1. Αύξηση στη συγκέντρωση του $CaCl_2$ στο ρυθμιστικό διάλυμα οδήγησε σε αυξημένη πρόσδεση της HDL, αλλά δεν επηρέασε την πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης. Η πρόσδεση της HDL και της LDL ήταν μεγαλύτερη στους 37°C, ενώ η πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η πρόσδεση της HDL αυξήθηκε με τη μείωση του pH, χωρίς να επηρεάσει την πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης. Προσθήκη σφιγγομυελίνης στα λιποσώματα αύξησε την πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης από την HDL, αλλά όχι και την πρόσδεση της ^{125}I-HDL. Οι χημικές ενώσεις BLT-1, 2, 3, 4 και 5, αναστέλλουν την επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων από την HDL. Η δοκιμασία πρόσδεσης έδειξε ότι στόχος των BLT's είναι ο ίδιος ο SR-BI. Αντικατάσταση της ομάδας θειόλης του BLT-1, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των θειοημικαρβαζών, με άτομο οξυγόνου, οδήγησε σε παραγωγή ανενεργού ισομορφής του BLT-1. Αυτές οι μελέτες απεκάλυψαν επίσης τη σημασία της υδρόφοβης «ουράς» του BLT-1 στην αναστολή της δράσης του SR-BI.

Μέρος της πρωτεΐνης που απομονώθηκε με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας υπεβλήθη σε περαιτέρω καθαρισμό με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, οι οποίες έδειξαν ότι τα παρασκευάσματα του SR-BI ήταν ομοιογενώς καθαρά. Επίσης διερευνήθηκε η επίδραση του pH, της διθειοθρεϊτόλης (dithiothreitol, DTT), της θερμοκρασίας και της ηλικίας των πρωτεϊνικών δειγμάτων, στη σταθερότητα και τον ολιγομερισμό του SR-BI κατά τη χρωματογραφία. Η κρυστάλλωση του καθαρισμένου SR-BI οδήγησε στην παραγωγή μικρών, εξαγωνικών κρυστάλλων, μήκους 30-40 μm, τα οποία υποβάλλονται σε κρυσταλλογραφικές μελέτες προκειμένου να διαλευκανθεί η ατομική δομή του SR-BI.

ABSTRACT

Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is the functional receptor for high density lipoprotein (HDL) and its three-dimensional structure has not been resolved. The main objective of my thesis was to produce sufficient quantities of homogeneously modified pure SR-BI suitable for crystallization studies. The long-term goal is to correlate the 3D structure with the known functions of SR-BI in the selective uptake of lipids and the efflux of free cholesterol. In order to produce large quantities of SR-BI with homogeneous modifications, the receptor was expressed in a mutant Human Embryonic Kidney (HEK) cell line, using a tetracycline-inducible system. The inducible expression of SR-BI in cell cultures in a bioreactor overcame the problem of cell aggregation and enhanced the protein yield. The mutant HEK cell line used for the expression of SR-BI was mutated in the N-acetyl Glucosaminyl Transferase I gene (GnTI). This mutation led to uniform glycosylation, with the high-mannose oligosaccharides $GlcNAc(Man)_{5.}$ The glycosylation properties of SR-BI were verified by Endoglycosidase H (EndoH) and N-Glycosidase F (PNGase F) digestions. PNGase F digests high mannose, as well as complex glycans. EndoH digests only high-mannose glycans. Western blotting analysis following these digestions verified the production of SR-BI with the expected degree of glycosylation (Mr ~54kDa). SR-BI produced on a small scale in cell cultures was purified by immunoaffinity chromatography from the cell lysates using Sepharose coupled to the monoclonal antibody 1D4. The antibody recognizes the epitope t1, a nonapeptide (TETSQVAPA) that corresponds to nine C-aminoacids of rhodopsin. The t1 epitope was engineered into the carboxy-terminus of SR-BI. Bound SR-BI was eluted by excess t1 and was detected by SDS-PAGE, Western blotting and silver staining. For large-scale spinner cultures the mutant HEK line (HEK293SGnTI^{-}TetR) was grown in a CELLIGEN PLUS bioreactor, where the temperature and the pH value as well as the oxygen, nitrogen, carbon dioxide and air content of the culture were controlled electronically. The cell density achieved in this bioreactor was approximately 5 X 10^6 cells/ ml, total volume 5.5L). Using large-scale immunoffinity chromatography, 5-8 milligrams of pure protein were produced per 5.5 liters of culture. Part of the purified protein was incorporated into

liposomes composed of cholesterol and phosphatidylcholine (and in some cases, sphingomyelin) which were used for a filter binding assay. This assay allowed the calculation of the quantity of lipoproteins bound to the proteoliposomes and of the cholesteryl ether taken up by them via SR-BI. These analyses showed that the purified glycosylation mutant SR-BI-t1 is functional and that it binds ^{125}I-HDL and uptakes cholesteryl ether from [^{3}H]-CE-HDL at levels similar to those of the wild type mSR-BI-t1. Increase in the concentration of $CaCl_2$ in the buffer leads to increased binding of HDL, but did not affect the uptake of cholesteryl ether. Binding of HDL and LDL is greatest at 37°C, while uptake of their cholesteryl ether increased as temperature increased. Binding of HDL increased as pH decreased, without affecting the uptake of cholesteryl ether. Addition of sphingomyelin in the liposomes increased the uptake of cholesteryl ether from HDL, but did not affect the binding of ^{125}I-HDL The chemical inhibitors BLT-1, 2, 3, 4 and 5 block the selective lipid uptake from HDL. These experiments revealed that the target of the BLTs is SR-BI itself. Substitution of the thiol group of BLT-1, which belongs to the thiosemicarbazone family of compounds, with an oxygen atom, created an inactive isoform of BLT-1. These studies also revealed the importance of the hydrophobic tail of BLT-1 for the inhibition of the SR-BI functions. A portion of the protein isolated by immunoaffinity chromatography underwent further purification by size exclusion and ion exchange chromatography, which showed that SR-BI preparations were homogeneously pure. The effect of pH, dithiothreitol (DTT), temperature and the age of the protein samples on their stability and oligomerization of SR-BI during the chromatography were also assessed. Crystallization of the purified SR-BI generated small hexagonal crystals 30-40 μm in length, which are being used currently in x-ray crystallographic studies for the elucidation of the atomic structure of SR-BI.

Περιεχόμενα

Α. Εισαγωγή……..1

1. Οι Υποδοχείς Καθαριστές……1

2. Δομή και Γενωμική Οργάνωση του SR-BI……1

3. Ν-Γλυκοζυλίωση και SR-BI……...…….4

4. Υποκυτταρική Εντόπιση του SR-BI……...……..10

5. Δράση του SR-BI……..……..12

Α. Ο SR-BI έχει Πολλαπλούς Συνδέτες……12

Μελέτες Πρόσδεσης του SR-BI σε Λιποπρωτεΐνες……..…….13

Β. Μεταφορά Λιπιδίων από τον SR-BI…….....……..15

α. Επιλεκτική Πρόσληψη Χοληστερόλης……..15

- Ρόλος των Καβεολίων στην Επιλεκτική Πρόσληψη Λιπιδίων……..18
- Ρόλος Λιπασών και Πρωτεϊνών Μεταφοράς Λιπιδίων του Πλάσματος στη Λειτουργία του SR-BI…….....……..19
- Ενδοκυτάρια Μεταφορά των Λιπιδίων της HDL και Υδρόλυση των Εστέρων Χοληστερόλης……21

β. Ρόλος του SR-BI στην Κυτταρική Έξοδο Χοληστερόλης……..…..21

6. Κρυστάλλωση του SR-BI…….….24

Α. Το Σύστημα Επαγώμενης Έκφρασης Πρωτεϊνών TET-ON που Εχρησιμοποιήθη για τη Μεγιστοποίηση της Έκφρασης του SR-BI σε Καλλιέργεια Κυττάρων σε Βιοαντιδραστήρα……...……26

Β. Χρήση Συστήματος Χρωματογραφίας Ανοσοσυγγενείας για τον Καθαρισμό του SR-BI…….....……..27

7. Ρόλος του SR-BI In Vivo…….……30

Β. Υλικά και Μέθοδοι……..……..32

Α. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ……..……32

1. Υδρόλυση DNA με Περιοριστικά Ένζυμα

2. Έκλουση Γραμμικών Μορίων DNA από Πήκτωμα Αγαρόζης…….....……..32

3. Κλωνοποίηση DNA σε Πλασμιδιακό Φορέα…….....……..33

4. Παρασκευή Δεκτικών για Μετασχηματισμό Βακτηριακών Κυττάρων *E. coli* DH5a..34

5. Μετασχηματισμός Βακτηριακών Κυττάρων *E.coli* με Θερμικό Σοκ…….35

6. Μικρής Κλίμακας Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με τη Μέθοδο της Αλκαλικής Λύσης Κυττάρων…….....……..36

7. Μεγάλης Κλίμακας Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με τη Χρήση Στήλης Qiagen..37

Β. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ……...……..38

1. Προσδιορισμός της Συγκέντρωσης Πρωτεϊνικού Δείγματος με τη Μέθοδο Lowry.…39

2. Ηλεκτροφορητική Ανάλυση Πρωτεϊνών σε Αποδιατακτικό Πήκτωμα SDS/ Πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE)……...…….39

3. Χρώση Αργύρου.....40

4. Ανάλυση Western……..……42

5. Πέψη Πρωτεϊνών με Ενδογλυκοζιδάση Η (EndoH) και Ν-Γλυκανάση (PNGaseF)….43

α. Πέψη με PNGaseF……..……43

β. Πέψη με EndoH…….44

Γ. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ…….…….44

1. Καλλιέργεια Κυτταρικών Σειρών HEK293S σε Τρυβλία……...……..44

2. Παροδική Διαμόλυνση Ευκαρυωτικών Κυττάρων HEK293S με τη Μέθοδο Lipofectamine……46

3. Δοκιμασία Πρόσληψης DiI-HDL από Κύτταρα που Εκφράζουν SR-BI……..……47

4. Κατασκευή Σταθερής Κυτταρικής Σειράς HEK293S για την Επαγώμενη Έκφραση του mSR-BI-t1 με τη Μέθοδο Λιποφεκταμίνης (Lipofectamine)……48

5. Καλλιέργεια Κυττάρων HEK293S σε Βιοαντιδραστήρα CELLIGEN PLUS……..…49

α. Συναρμολόγηση του Βιοαντιδραστήρα……...……..49

β. Ενεργοποίηση του Βιοαντιδραστήρα ……...……51

γ. Βαθμονόμηση του pH-μέτρου……...……51

δ. Αποστείρωση της Δεξαμενής 14.4L…….……52

ε. Βαθμονόμηση του Μετρητή Διαλυμένου Οξυγόνου (Dissolved Oxygen, DO)……....52

ζ. Δοκιμή του Βιοαντιδραστήρα για Μόλυνση…….……53

η. Καλλιέργεια Κυτταρικής Σειράς HEK293SGnTI-TetR[mSR-BI-t1]……53

θ. Αποσυναρμολόγηση και Πλύσιμο της Δεξαμενής 14.4L…….....……..57

6. Εκτίμηση της Ποσότητας mSR-BI-t1 στην Κυτταρική Πελέτα HEK293SGnTI⁻ TetR[mSR-BI-t1]……..…….58

Δ. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ mSR-BI-t1 ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΟΣΟΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

1. Προετοιμασία Μονοκλωνικού Αντισώματος 1D4……...…….58

2. Προετοιμασία των Σφαιριδίων CNBr-Σεφαρόζης 4B……..…….59

3. Σύζευξη 1D4 – Σφαιριδίων Σεφαρόζης…….59

4. Εκτίμηση της Ικανότητας των Σφαιριδίων 1D4-Σεφαρόζης να Δεσμεύουν mSR-BI-t1……59

5. Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας Μεγάλης και Μικρής Κλίμακας για την Απομόνωση του mSR-BI-t1……..……60

Ε. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ^{125}I-HDL/LDL ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ [^{3}H]-ΑΙΘΕΡΩΝ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (CE) ΑΠΟ [^{3}H]CE-HDL/LDL ΑΠΟ mSR-BI-t1 ΑΝΑΣΥΣΤΗΜΕΝΟ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ…….....……..61

1. Παρασκευή Λιποσωμάτων……62

2. Παρασκευή Πρωτεολιποσωμάτων…….....……..62

3. Δοκιμασία Πρόσδεσης ^{125}I-HDL/LDL ή Πρόσληψης [^{3}H]-Αιθέρων Χοληστερόλης (CE) από [^{3}H]-CE HDL/LDL…….....……..62

4. Πλύσεις των Φίλτρων και Μέτρηση της Φυσικής των Ραδιενέργειας……..……63

Z. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ 125I-HDL ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ [3H]-ΑΙΘΕΡΩΝ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (CE) ΑΠΟ [3H]CE-HDL ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ SR-BI…….……63

Η. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ HDL ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

1. Λήψη Αίματος και Απομόνωση Πλάσματος από Ποντικούς και από Άνθρωπο……..64

2. Απομόνωση HDL με Υπερφυγοκέντριση Κλασμάτωσης Πυκνότητας……65

3. Ιωδίωση της HDL……..……66

4. Σήμανση HDL με [^{3}H] Αιθέρες Χοληστερόλης……...…….66

Γ. Αποτελέσματα……..….68

1. Κατασκευή Σταθερής Κυτταρικής Σειράς HEK που Υπερεκφράζει Επαγώμενα τον mSR-BI-t1 με Περιορισμένη και Ομοιογενή Γλυκοζυλίωση……..……..68

Α. Κατασκευή Πλασμιδίου pACMV-tetO-mSR-BI-t1…….……68

Β. Παροδική Έκφραση του mSR-BI-t1 σε Αγρίου Τύπου και Μεταλλαγμένες Κυτταρικές Σειρές HEK293S και Δοκιμασία Πρόσληψης DiI-HDL από Κύτταρα που Εκφράζουν τον SR-BI…….……71

Γ. Κατασκευή Σταθερής Κυτταρικής Σειράς HEK293S GnTI⁻ TetR [mSR-BI t1]……...72

Δ. Προσδιορισμός του Κυτταρικού Κλώνου HEK293SGnTI-TetR που Εκφράζει τον mSR-BI-t1 σε Μεγαλύτερο Βαθμό με Ανάλυση Western……...……..76

2. Μικρής Κλίμακας Καθαρισμός της Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας……...……82

3. Εκτίμηση των Χαρακτηριστικών Γλυκοζυλίωσης της Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 Μέσω Πέψης με Ενδογλυκοζιδάση Η (EndoH) και N-Γλυκανάση (PNGase F)…….87

4. Σύγκριση των Ιδιοτήτων Πρόσδεσης του Αγρίου Τύπου και Μεταλλαγμένου mSR-BI-t1 με Πραγματοποίηση Κυτταρικής Δοκιμασίας Πρόσδεσης Κορεσμού της ^{125}I-HDL...89

5. Μεγάλης Κλίμακας Καλλιέργεια Κυτταρικής Σειράς HEK293S GnTI$^{(-)}$ TetR [mSR-BI-t1] σε Βιοαντιδραστήρα Celligen Plus…….....……..92

6. Προσδιορισμός της Περιεκτικότητάς σε mSR-BI-t1 της Κυτταρικής Πελέτας από Μεγάλης Κλίμακας Καλλιέργεια Κυτταρικής Σειράς HEK293SGnTI⁻TetR[mSR-BI-t1]

7. Μεγάλης Κλίμακας Καθαρισμός της Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας…….93

8. Έλεγχος της Λειτουργικότητας της Απομονωμένης Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με τη Δοκιμασία των Λιποσωμάτων…….....……..99

9. Μελέτη της Αλληλεπίδρασης της HDL και της LDL με τον mSR-BI-t1 με Χρήση της Δοκιμασία των Λιποσωμάτων…….....……..103

10. Εκτίμηση της Ποιότητας της Απομονωμένης Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης και Ανταλλαγής Ιόντων και Εύρεση των Βέλτιστων Συνθηκών για την Κρυστάλλωσή της……111

11. Παραγωγή Κρυστάλλων mSR-BI-t1.....146

12. Αλληλεπίδραση HDL Ανθρώπου και Ποντικού με Κύτταρα που Εκφράζουν Αγρίου Τύπου SR-BI και Πρωτεο-Λιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης / Χοληστερόλης / mSR-BI-t1.....153

Δ. Συζήτηση……..……165

1. Μελέτη των Ιδιοτήτων του SR-BI in vitro και ο Φυσιολογικός του Ρόλος……....171

2. Συσχετισμός των Γνωστών Λειτουργιών του SR-BI με την Παθοφυσιολογία Ποντικών knockout για το Γονίδιο SR-BI ή για τα Γονίδια των SR-BI και apoE (dKO)……....173

Βιβλιογραφία.....181

Παράρτημα Α……..…..204

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ APOE3 ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΥ

Παράρτημα Β……...220

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΣΤΟΧΟΥ, ΜΟΡΙΩΝ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ HDL, SR-BI

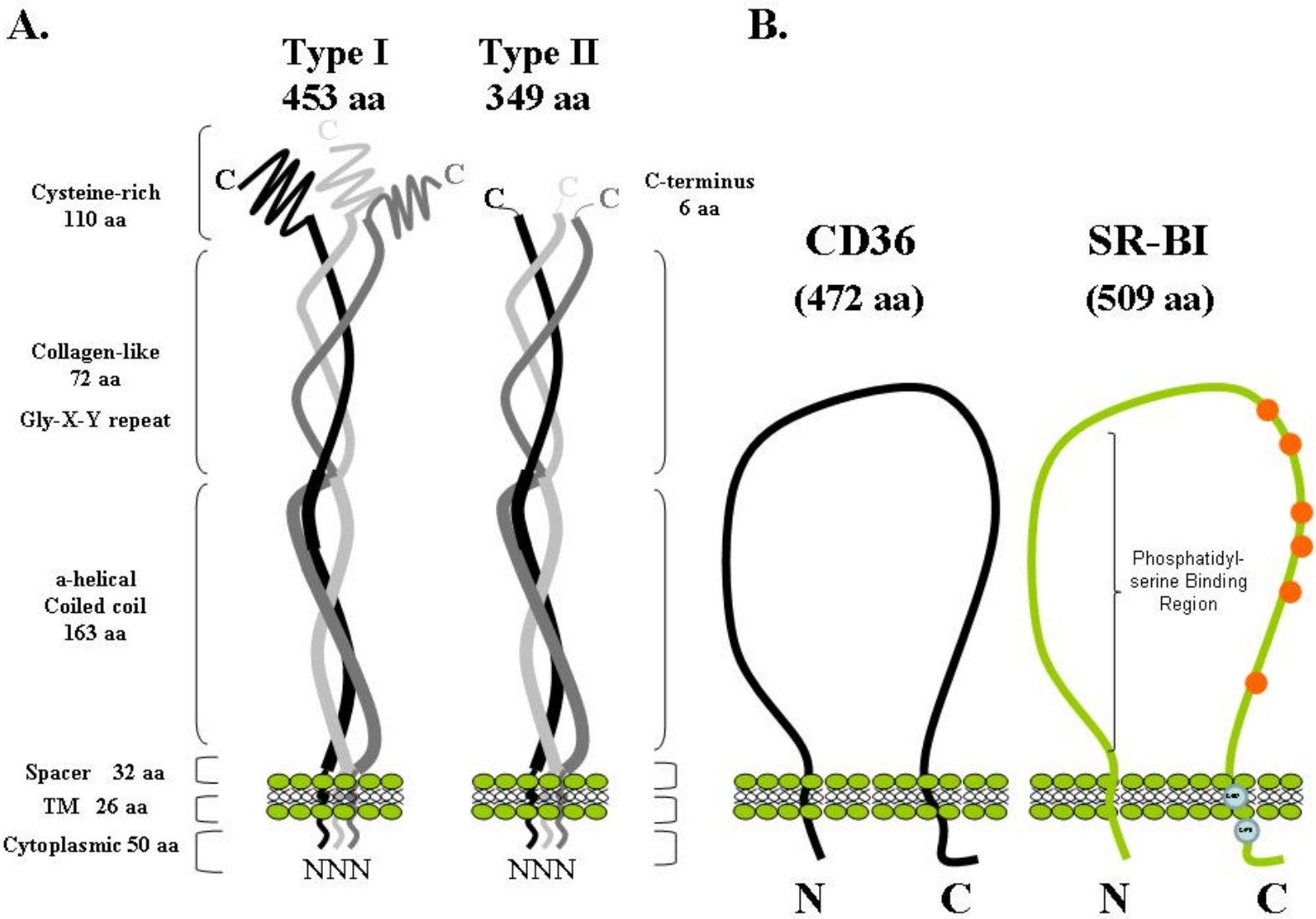
Α. Εισαγωγή

1. Οι Υποδοχείς Καθαριστές

Οι υποδοχείς-καθαριστές (scavenger receptors ή με τη συντετμημένη τους ονομασία SR) είναι μια ομάδα υποδοχέων που υπάρχει στα μακροφάγα, οι οποίοι αναγνωρίζουν λιποπρωτεΐνες οι οποίες έχουν τροποποιηθεί με οξείδωση ή ακυλίωση. Οι υποδοχείς-καθαριστές (SR) απομακρύνουν (scavenge) την τροποποιημένη LDL καθώς και μια μεγάλη ποικιλία μακρομορίων με αρνητικό φορτίο. Λόγω της ευρείας ειδικότητας που έχουν πιστεύεται ότι οι υποδοχείς-καθαριστές (SR) συμμετέχουν στην απομάκρυνση πολλών ξένων και άχρηστων ουσιών στο σώμα. Οι υποδοχείς-καθαριστές (SR) χωρίζονται σε τρεις τάξεις, τις Α, Β και C, ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους. Οι τάξης Α, τύπου 1 (SR-A1) και τύπου 2 (SR-A2) έχουν μοριακό βάρος περίπου 220-250 kDa (το μοριακό βάρος κάθε μονομερούς είναι περίπου 80 kDa), εκφράζονται κυρίως στα μακροφάγα και σχηματίζουν ένα τριμερές coiled coil ελίκων, που είναι σημαντικό για την πρόσδεση των συνδετών τους. Οι SR-AI και SR-AII αποτελούνται από 1) ένα κυτταροπλασματικό αμινο-τερματικό τμήμα, 2) ένα διαμεμβρανικό τμήμα, 3) ένα ενδιάμεσο τμήμα «spacer», 4) μια α-έλικα, 5) ένα τμήμα που μοιάζει με κολλαγόνο και 6) ένα τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνες (στην περίπτωση του SR-A1 αλλά όχι του SR-A2). Οι υποδοχείς τάξης C είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των οποίων το αμινο-τελικό τμήμα βρίσκεται έξω από το κύτταρο. Οι υποδοχείς-καθαριστές (SR) τάξης Β περιγράφονται κατωτέρω (Εικ. 1).

2. Δομή και Γενωμική Οργάνωση του SR-BI

Ο υποδοχέας-καθαριστής SR-BI (Scavenger Receptor Class B, Type I), ο οποίος είναι ένας τάξης Β υποδοχέας, είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 509 αμινοξέων (Εικ. 1Β). Αποτελείται από δύο εσωτερικές, υδρόφοβες, διαμεμβρανικές περιοχές, που συνδέονται με τα βραχέα κυτταροπλασματικά αμινο- και καρβοξυ- τελικά



Εικόνα 1. Υποδοχείς-Καθαριστές (Scavenger Receptors) Τάξης Α (Α) και Τάξης Β (Β). Με Αγκύλη Δείχνεται η Περιοχή του SR-BI Όπου Προσδένεται η Φωσφατιδυλσερίνη, ενώ οι Γαλάζιοι Κύκλοι Αντιστοιχούν στις Παλμιτυλιωμένες Κυστεΐνες του και οι Κόκκινοι Κύκλοι Αντιστοιχούν στις Μη-Παλμιτυλιωμένες Κυστεΐνες του.

Zannis et al, 2005. Lipoproteins and Atherogenesis in "Molecular Mechanisms of Atherosclerosis", J. Loscalzo Editor. Taylor and Francis, p. 111-174.

της άκρα. Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Ο SR-BI περιέχει μια ομάδα συντηρημένων κυστεϊνών (Εικ. 1). Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των διαφόρων πρωτεϊνών SR-BI από διαφορετικά είδη θηλαστικών είναι 70-80% ομόλογες.

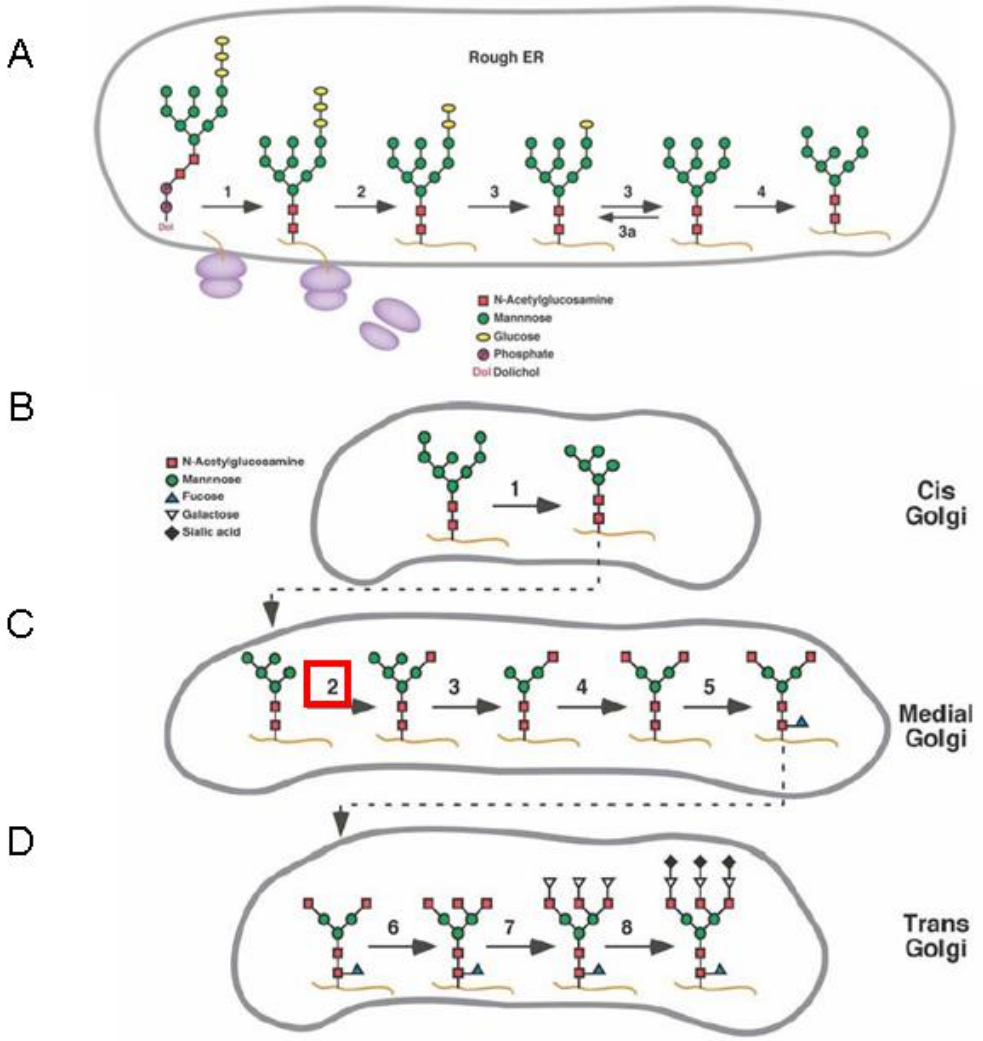
Η δομή της εικόνας 1 ισχύει, όχι μόνο για τον SR-BI, αλλά και όλα σχεδόν τα μέλη της οικογένειας πρωτεινών στην οποία ανήκει αυτός. Η οικογένεια αυτή ονομάζεται υπεροικογένεια CD36 (1), και περιλαμβάνει τις πρωτείνες CD36 (2) και LIMPII [lysosomal integral membrane protein, (3)], δύο πρωτείνες της Drosophila melanogaster, που ονομάζονται emp (4) και croquemort [που αποτελεί υποδοχέα των μακροφάγων, (5,6)], την SnmP-1 [μεμβρανική πρωτείνη των οσφρητικών κυττάρων του μεταξοσκώληκα, (7)], μια πρωτεΐνη του Caenorhabditis elegans (GenBank accession no. Z54270) και άλλες. Φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων της οικογένειας CD36 έδειξε ότι τα LIMPII, SR-BI, emp και CD36 απέκλιναν από ένα κοινό προγονικό γονίδιο νωρίς κατά την εξέλιξη (1). Μέλη της οικογένειας των γονιδίων της CD36 αυτής τα οποία δεν ακολουθούν την προαναφερθείσα δομή είναι η croquemort και ένα δυνητικό μετάγραφο του SR-BI, ο SR-BIII (8). Τα μέλη αυτά έχουν μια μοναδική υδρόφοβη περιοχή στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο (5,8).

Το γονίδιο SR-BI έχει μέγεθος 59.8 kb και αποτελείται από 12 εξώνια.. Έχει περιγραφεί ένα δεύτερο μετάγραφο του SR-BI που προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του RNA και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SR-BII. Στον SR-BII, τα 42 καρβοξυ-τελικά αμινοξέα του SR-BI, που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, έχουν αντικατασταθεί από 40 διαφορετικά αμινοξέα (9) (Εικ. 1). Ο SR-BI και τα άλλα μέλη της οικογένειας του CD36, έχουν επίσης ομοιότητες στη γενομική τους οργάνωση (10, 11). Το ανθρώπινο γονίδιο SR-BI, που ονομάσθηκε ClaI, κλωνοποιήθηκε αρχικά ως ομόλογο των CD36 και LIMPII, και χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 12 (1,10, 12). Το γονίδιο του SR-BI του ποντικού απεμονώθη αρχικά με κλωνοποίηση έκφραση (expression cloning), με βάση την ικανότητά του να προσδένει τροποποιημένη LDL. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας αυτός επίσης αναγνωρίζει τη λιποπρωτείνη υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoprotein, HDL) (13).

3. Ν-Γλυκοζυλίωση και SR-BI

Στην ενότητα αυτή γίνεται εκτεταμένη ανάλυση της μετα-μεταφραστικής γλυκοζυλίωσης του SR-BI διότι μη-ομοιόμορφη γλυκοζυλίωση επηρεάζει την κρυστάλλωση του SR-BI που είναι το κύριο αντικείμενο της διατριβής αυτής. Η Ν-γλυκοζυλίωση είναι απαραίτητη για τη σωστή αναδίπλωση, την έκκριση και την ενδοκυττάρια μεταφορά πολλών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, απουσία Ν-ολιγοσακχαριτών, τα IgG αντισώματα και η α1-αντιπρωτεάση δεν εκκρίνονται αλλά κατακρατώνται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης. Ειδικά για τον SR-BI, η γλυκοζυλίωση διαδραματίζει σοβαρό ρόλο για την ενδοκυττάρια επεξεργασία ή/και μεταφορα του, καθώς και για τη δράση του. Αυτό φάνηκε από τη μετάλλαξη των θέσεων γλυκοζυλίωσής του Asn-108 και Asn-173, η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη χαμηλή έκφρασή του μεταλλαγμένου υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου και τη χαμηλού επιπέδου έως μη ανιχνεύσιμη επεξεργασία όλων των Ν-γλυκανών του στη σύμπλοκη μορφή τους, όπως φάνηκε από την πλήρη ευαισθησία τους στην πέψη με ενδογλυκοζιδάση Η [βλέπε πιο κάτω και «Αποτελέσματα», (14)].

Για τη σύνθεση Ν-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών, μία πρόδρομος ομάδα 14-μονοσακχαριτών προστίθεται αρχικά στην ασπαραγίνη της πολυπεπτιδικής αλύσου της πρωτεΐνης-στόχου. Η δομή αυτής της ομάδας είναι κοινή για τους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμους, και αποτελείται από 3 μόρια γλυκόζης, 9 μόρια μανόζης, και 2 μόρια Ν-ακετυλ-γλυκοζαμίνης (Εικ. 2, A-D). Ένα σύνθετο σύνολο αντιδράσεων συνδέει αυτή τη διακλαδισμένη αλυσίδα, μέσω ενός υπολείματος πυροφωσφορυλίου, με ένα μόριο-φορέα που ονομάζεται δολιχόλη και είναι ένα ακόρεστο λιπίδιο μακράς αλύσου (75-95 άτομα C). Η βιογένεση αυτής της προδρόμου ένωσης απαιτεί ένζυμα της μεμβράνης του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και περιλαμβάνει τη διαδοχική προσθήκη μονοσακχαριτών στη φωσφορική δολιχόλη. Η ένωση αυτή δολιχόλης-πυροφωσφορυλίου και ολιγοσακχαρίτη σχηματίζεται επομένως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και προσανατολίζεται έτσι ώστε η δολιχόλη να είναι ενσωματωμένη στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και ο ολιγοσακχαρίτης να στρέφεται προς τον



Εικόνα 2. Ακολουθία Ν-Γλυκοζυλίωσης στα Ευκαρυωτικά Κύτταρα που Αρχίζει στο Αδρό Ενδοπλασματικό Δίκτυο και Ολοκληρώνεται στο Σύστημα Golgi.

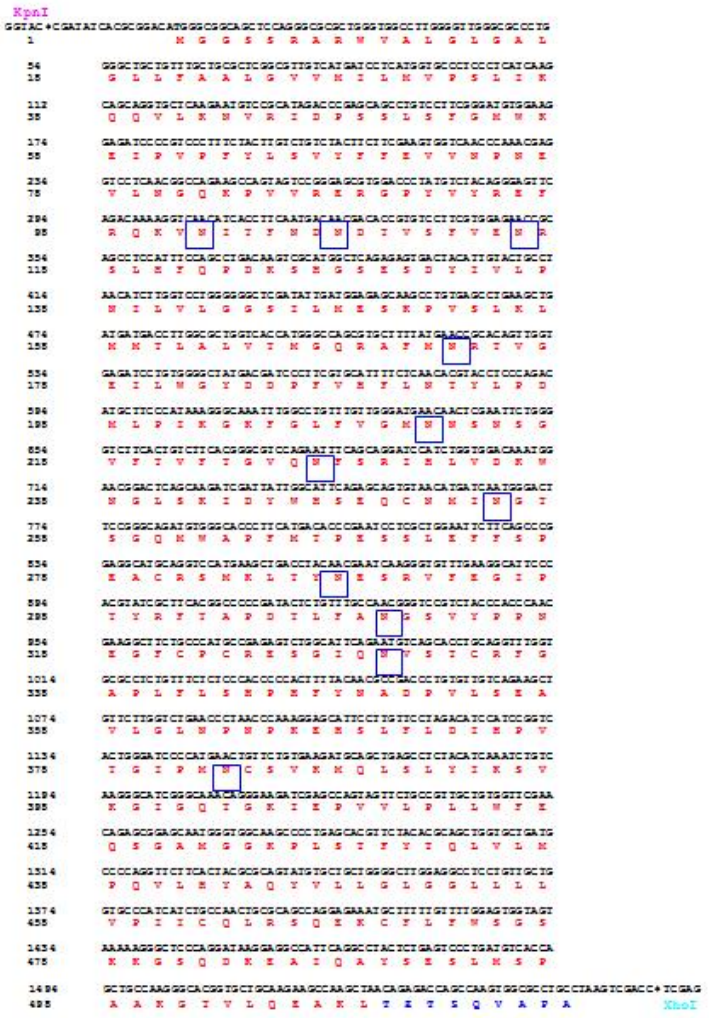
αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Έπειτα, ο ολιγοσακχαρίτης μεταφέρεται en bloc στο κατάλληλο σημείο στην πολυπεπτιδική αλυσίδα καθώς αυτή μεταφέρεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (Εικ. 2Α, βήμα 2). Συγκεκριμένα, η αλυσίδα των ολιγοσακχαριτών συνδέεται στην ασπαραγίνη της τριπεπτιδικής ακολουθίας Asn-X-Ser ή Asn-X-Thr, όπου το Χ μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός από Pro. Αυτή η ακολουθία είναι γνωστή ως αλληλουχία/σήμα γλυκοζυλίωσης (glycosylation sequon). Αυτή η αντίδραση πραγματοποιείται από την τρανσφεράση των ολιγοσακχαριτών, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου που στρέφεται προς τον αυλό του.

Ο SR-BI έχει 11 σήματα N-γλυκοζυλίωσης στη cDNA αλληλουχία του (Εικ. 3) και έχει δειχθεί ότι σε κυτταροκαλλιέργειες, γλυκοζυλιώνεται και στους 11 επιτόπους κατά τη μετάφρασή του, αντίθετα από ότι συμβαίνει με τις περισσότερες πρωτεΐνες, όπου μερικές μόνο από τις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης είναι κατειλημένες (15,14). Συγκεκριμένα, αυτό δείχθηκε με μετάλλαξη καθενός των 11 σημάτων γλυκοζυλίωσης (Asn→Gln ή Thr→Ala) και παρατηρήθηκε ότι και στις 11 περιπτώσεις, αυτό αύξησε την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτείνης, προφανώς λόγω απουσίας του αντίστοιχου N-ολιγοσακχαρίτη (14) . Επομένως, Ο SR-BI παρουσιάζει εκτεταμένη γλυκοζυλίωση και σε αυτήν οφείλεται η διαφορά ανάμεσα στη μάζα που προβλέπεται από την αμινοξική του αλληλουχία (~57 kDa) και σε αυτήν που παρατηρείται με ανοσοχημικές μεθόδους (western) (~82 kDa).

Μετά από τη μεταφορά του ολιγοσακχαρίτη στην ασπαραγίνη, μόλις η πρωτεΐνη διπλωθεί σωστά και ενώ είναι ακόμη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα τρία υπολείμματα γλυκόζης και ένα συγκεκριμένο υπόλειμα μανόζης, αφαιρούνται από την αλυσίδα με τη βοήθεια τριών διαφορετικών ενζύμων και η πρωτεΐνη γίνεται διαθέσιμη για εξαγωγή της από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικ 2Α, βήματα 2,3 και 4) .

Περαιτέρω τροποποίηση των ολιγοσακχαριτών στη σύμπλοκη μορφή τους αρχίζει 20-30 λεπτά μετά τη σύνθεση της πρωτεΐνης, κατά το χρόνο που η πρωτεΐνη βρίσκεται στο σύμπλεγμα Golgi. Έτσι, βαθμιαία αφαιρούνται έξι από τα εννέα αρχικά υπολείματα

μανόζης και αυτό οδηγεί στο σχηματισμό μιας ‘πυρηνικής’ δομής 3 υπολειμάτων μανόζης και 2 υπολειμάτων N-ακετυλογλυκοζαμίνης (Εικ. 2B και 3C, βήματα 1, 2, 3, 4 και 5). Εάν ο ολιγοσακχαρίτης πρόκειται να γίνει σύμπλοκος, αυτή η πυρηνική δομή επιμηκύνεται με την προσθήκη ποικίλων μονοσακχαριτών, όπως η γαλακτόζη, η N-ακετυλογλυκοζαμίνη, η φουκόζη και το σιαλικό οξύ, που γίνεται στο trans Golgi (Εικ



Εικόνα 3. Σήματα N-Γλυκοζυλίωσης στη cDNA Αλληλουχία του SR-BI.

2D, βήματα 6,7 και 8). Οι σύμπλοκοι Ν-ολιγοσακχαρίτες είναι μία από τις δύο βασικές κατηγορίες Ν-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών και ονομάζονται έτσι επειδή μπορούν να περιέχουν σχεδόν οποιονδήποτε αριθμό άλλων μονοσακχαριτών, πέραν της μανόζης και της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης, καθώς και περισσότερων των δύο αρχικών Ν-ακετυλογλυκοζαμινών.

Η άλλη κατηγορία ολιγοσακχαριτών που εμφανίζεται στις πρωτεΐνες είναι οι ολιγοσακχαρίτες υψηλής μανόζης, οι οποίοι είναι κατ'ουσίαν, δύο Ν-ακετυλγλυκοζαμίνες με πολλά υπολείμματα μανόζης, συχνά σχεδόν τόσα όσα υπάρχουν στους πρόδρομους ολιγοσακχαρίτες προτού αυτοί να συνδεθούν στην πρωτεΐνη (Εικ. 2Α). Έτσι, μπορεί να έχουν την ίδια δομή με τις ενδιάμεσες μορφές (Man)9(GlcNAc)2 έως (Man)5(GlcNAc)2 που εμφανίζονται κατά την επεξεργασία των συμπλόκων ολιγοσακχαριτών (Εικ. 2Α, 2Β). Οι υψηλής μανόζης ολιγοσακχαρίτες (Man)8(GlcNAc)2 (Εικ. 2Α) σχηματίζονται εάν το cis ένζυμο του συμπλέγματος Golgi που αφαιρεί υπολείματα μανόζης, η α-μανοζιδάση-Ι, η οποία καταλύει την αντίδραση 1 της Εικόνας 2Β, δεν μπορεί να δράσει στο συγκεκριμένο ολιγοσακχαρίτη. Οι υψηλής μανοζης ολιγοσακχαρίτες (Man)5(GlcNAc)2 προκύπτουν εάν η αντίδραση 2 της Εικόνας 2C, η οποία καταλύεται από το ένζυμο τρανσφεράση της Ν-ακετυλγλυκοζαμίνης, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί. Το τελευταίο αυτό φαινόμενο χρησίμευσε στην παρούσα διατριβή, όπως εξηγείται πιο κάτω.

Οι πρωτεΐνες μπορούν να είναι γλυκοζυλιωμένες και με τους δύο τύπους ολιγοσακχαριτών στα διάφορα τμήματά τους. Το εάν ένας ολιγοσακχαρίτης θα είναι υψηλής μαννόζης ή σύνθετος πιστεύεται ότι εξαρτάται από τη δυνατότητα πρόσβασης σε αυτόν, πρωτεινών που τροποποιούν σακχαρίτες στο σύμπλεγμα Golgi. Εάν ο σακχαρίτης είναι σχετικά απρόσιτος, θα μείνει πιθανότατα στην αρχική μορφή υψηλής μαννόζης. Εάν είναι προσιτός, είναι πιθανό ότι πολλά από τα υπολείμματα μαννόζης θα αφαιρεθούν και ο σακχαρίτης θα τροποποιηθεί περαιτέρω με την προσθήκη και άλλων ομάδων, όπως αναφέρθηκε.

Η στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης που διέπεται από την αμινοξική της σύνθεση, καθορίζουν εάν ένας συγκεκριμένος Ν-συνδεδεμένος ολιγοσακχαρίτης θα γίνει σύμπλοκος ή θα παραμείνει υψηλής μανόζης. Επιπλέον, διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι σε έναν οργανισμό έχουν διαφορετικά ένζυμα και έτσι η ίδια πρωτεΐνη, που παράγεται από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, μπορεί να έχει διαφορετική Ν-γλυκοζυλίωση. Για παράδειγμα, κάποια υπολείματα ασπαραγίνης της γλυκοπρωτεΐνης Hemagglutinin (HA) του ιού της γρίππης έχουν συμπλόκους ολιγοσακχαρίτες όταν ο ιός μεγαλώνει σε έναν κυτταρικό τύπο, αλλά υψηλής μανόζης ολιγοσακχαρίτες όταν ο ιός μεγαλώνει σε άλλον κυτταρικό τύπο.

Στην περίπτωση του SR-BI, κάποιοι από τους 11 Ν-ολιγοσακχαρίτες του , αλλά όχι όλοι, μετατρέπονται σε σύμπλοκες αλυσίδες υδατανθράκων κατά τη μετάβασή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο trans Golgi (15). Αυτό το γνωρίζουμε διότι η πέψη της πρωτείνης με EndoH, η οποία πέπτει μόνο υψηλής μαννόζης ολιγοσακχαρίτες, οδηγεί στην εμφάνιση δύο ζωνών μετά από ανάλυση Western (βλέπε «Αποτελέσματα»).

4. Υποκυτταρική Εντόπιση του SR-BI

Μελέτες μεταβολικής σήμανσης έδειξαν ότι ο τόσο ο SR-BI όσο και ο CD36 είναι ακυλιωμένος με λιπαρά οξέα (15, 16). Ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων έδειξε ότι τα κύρια σημεία παλμιτοϋλίωσης του SR-BI είναι οι κυστεΐνες 462 και 470, που βρίσκονται στην καρβοξυ-τελική διαμεμβρανική καθώς και στην κυτταροπλασματική του περιοχή (Εικ.1) (17). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι υδρόφοβες αλυσίδες των λιπαρών οξέων των ακυλιωμένων πρωτεϊνών, συνδέονται στη μία ή στην άλλη στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης και άλλων κυτταρικών μεμβρανών, χωρίς η ίδια η πρωτεΐνη να εισέρχεται στις κυτταρικές μεμβράνες.

Μ'αυτό τον τρόπο, η ακυλίωση με λιπαρά οξέα χρησιμεύει ως σήμα για τη συγκέντρωσή των πρωτεϊνών σε περιοχές (microdomains) της πλασματικής μεμβράνης, πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια, οι οποίες καλούνται καβεόλια (caveolae). Πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες και υπό ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης, έδειξαν ότι οι SR-BI και

SR-BII επίσης συγκεντρώνονται σε καβεόλια (caveolae) (15,18). Η αναστολή της ακυλίωσης του SR-BI μετά από διπλή μετάλλαξη των κυστεϊνών 462 και 470 δεν επηρέασε τον εντοπισμό του SR-BI στην κυτταρική μεμβράνη και αυτό φανερώνει ότι τα μοτίβα του SR-BI που ρυθμίζουν τον εντοπισμό του στα καβεόλια παραμένουν άγνωστα (17).

Ο SR-BI εκφράζεται σε μια σειρά πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων, όπως ηπατοκύτταρα, χολαγγειοκύτταρα και εντεροκύτταρα (19-26). Σε τομές φυσιολογικού ήπατος ποντικού ή αρουραίου, ο SR-BI εντοπίζεται κυρίως στην βασικοπλάγια πλευρά των ηπατοκυττάρων (20,21), ενώ σε ήπαρ ποντικού που διεμολύνθη με αδενοϊούς in vivo ο SR-BI εντοπίζεται τόσο στην κορυφαία (apical) όσο και στη βασικοπλάγια (basolateral) επιφάνεια των κυττάρων (19). Ο SR-BI εντοπίσθη στη βασικοπλάγια μεμβράνη κυττάρων MDCK που διεμολύνθησαν με το γονίδιο του SR-BI (22,23) και στην κορυφαία πλευρά των εντεροκυττάρων (24,25), των κυττάρων CaCo2 (24) και των χολαγγειοκυττάρων (26). Οι διαφορές αυτές στην υποκυτταρική εντόπιση του SR-BI σε διάφορα είδη στα πολωμένων κυττάρων μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στα μονοπάτια κατανομής των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των μεμβρανών και ίσως στην έκφραση και στη δράση πρωτεϊνών προσαρμοστών (adapter) και πρωτεϊνών συνοδών (chaperone).

Πρωτεΐνες που προσδένονται στο καρβοξυτερματικό κυτταροπλασματικό άκρο του SR-BI και πιθανόν να ρυθμίζουν την εντόπιση, τη σταθερότητα και λειτουργία του SR-BI, έχουν απομονωθεί από παρασκευάσματα μεμβρανών ήπατος αρουραίου (27). Μία από αυτές τις πρωτεΐνες, που καλείται CLAMP (carboxy-terminal linking and modulating protein), περιέχει πολλαπλές περιοχές PDZ που αλληλεπιδρούν με τα PDZ interacting domains (RKL) που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο του SR-BI (27). Συνέκφραση της CLAMP και του SR-BI μετά από διαμόλυνση κυττάρων επηρέασε τη σταθερότητα του SR-BI, καθώς και την αποτελεσματικότητα της μετατροπής των εστέρων της χοληστερόλης της HDL που προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω του SR-BI σε ενδοκυττάρια μη-εστεροποιημένη χοληστερόλη (27). Η παρατήρηση αυτή φανερώνει ότι η αλληλεπίδραση του SR-BI μέσω των PDZ περιοχών του, με το CLAMP συμβάλλει στη μεταφορά και την υδρόλυση εστέρων χοληστερόλης στο κύτταρο (27). Πιστεύεται

επίσης ότι η CLAMP ενδέχεται να συμβάλλει στη βασικοπλάγια κατανομή του SR-BI στα ηπατοκύτταρα (27). Μεταλλάξεις στο καρβοξυ-τελικό άκρο του SR-BI έδειξαν ότι η περιοχή του SR-BI που αλληλεπιδρά με την CLAMP είναι απαραίτητη για την έκφρασή του στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων (28). Επιπλέον μελέτες απαιτούνται για την κατανόηση της λειτουργικής σημασίας της εντόπισης του SR-BI στη βασικοπλάγια ή κορυφαία μεμβράνη, σε διάφορα κύτταρα και την ταυτοποίηση των αλληλουχιών του SR-BI που είναι υπεύθυνα για την πολικότητα και την υποκυτταρική του εντόπιση, καθώς και του ρόλου των πρωτεϊνών (όπως η CLAMP) που αλληλεπιδρούν με τον SR-BI.

5. Δράση του SR-BI

A. Ο SR-BI έχει Πολλαπλούς Συνδέτες

Ο SR-BI είναι ένας υποδοχέας με πολλούς συνδέτες, κυρίως τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες (όπως η ακετυλιωμένη ή οξειδωμένη LDL και HDL) και μη τροποποιημένες (όπως η LDL και η HDL) καθώς και ανιονικά φωσφολιπίδια (29, 30, 31, 32, 33, 34, 36). Ο SR-BI δεν αναγνωρίζει μια μεγάλη ποικιλία πολυ-ανιονικών μορίων (όπως η φουκοειδίνη, πολυγουανοσίνη κλπ.), τα οποία είναι συνδέτες υποδοχέων-καθαριστών άλλων τάξεων (29, 30, 31, 32, 35, 37, 38, 39, 40).

Ο SR-BI, εκτός από τις μη-τροποποιημένες και τις τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες (βλέπε πιο κάτω), αναγνωρίζει επίσης μια μεγάλη ποικιλία συνδετών, όπως μαλεϋλιωμένη BSA (32) και πρωτεΐνες που έχουν υποστεί εκτεταμένη γλυκοζυλίωση (Advanced Glycation End-product modified proteins, AGE) (41). Πιστεύεται ότι η βασική συμβολή της μαλεϋλίωσης και της γλυκοζυλίωσης είναι η παροχή κατάλληλα κατανεμημένων αρνητικών φορτίων στις αντίστοιχες πρωτεΐνες, το οποίο θεωρείται πρόσφορο για την πρόσδεση στον SR-BI. Επίσης, ο SR-BI προσδένει ανιονικά, αλλά όχι επαμφοτερίζοντα, φωσφολιπίδια (όπως η φωσφατιδυλσερίνη που βρίσκονται στην επιφάνεια αποπτωτικών κυττάρων ή στη μορφή των λιποσωμάτων) (42, 43). Σε κύτταρα Sertoli ο SR-BI προσδένεται στην φωσφατιδυλσερίνη των αποπτωτικών σπερματογονίων και συμβάλλει

στη φαγοκυττάρωσή τους. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι η φωσφατιδυλσερίνη προσδένεται στα αμινοξέα 33-191 του υποδοχέα, τα οποία αντιστοιχούν στο εξωκυττάριο αμινο-τελικό τμήμα του (Εικ. 1) (44). Ο SR-BI καθώς και ο CD36 ήταν οι πρώτοι καλά χαρακτηρισμένοι υποδοχείς της φωσφατιδυλσερίνης (42). Ευρέθη ότι κύτταρα που εκφράζουν τον SR-BI προσδένουν γηρασμένα και αποπτωτικά κύτταρα (τα οποία έχουν υψηλά επίπεδα φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής τους μεμβράνης). Έχει προταθεί ότι μ'αυτό τον τρόπο ο SR-BI συμβάλλει στην απομάκρυνση αυτών των κυττάρων κατά την ανάπτυξη, την αναδόμηση των ιστών καθώς και σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις (42, 43, 45, 46, 47). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι, έκφραση του SR-BI σε κύτταρα CHO (Chinese Hamster Ovary cells) (48) καθώς και σε κύτταρα μικρογλοίας και κύτταρα λείων μυών εγκεφαλικών αγγείων σε καλλιέργεια οδηγεί στην πρόσδεση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (49, 50) και υποδεικνύει πιθανό ρόλο του SR-BI στη νόσο Alzheimer. Πιο πρόσφατα, βρέθηκε ότι η γλυκοπρωτεΐνη E2 του καψιδίου του ιού της ηπατίτιδας C είναι συνδέτης του SR-BI του ανθρώπου, και υποδεικνύει ότι ο SR-BI ενδέχεται να αποτελεί υποδοχέα του ιού της ηπατίτιδας C (51). Ανάλυση των μηχανισμών με τους οποίους πολλοί συνδέτες με πολύ διαφορετικές δομές προσδένονται στον SR-BI, φανέρωσε την ύπαρξη περίπλοκων αλληλεπιδράσεων και πολλαπλών περιοχών πρόσδεσης στον SR-BI (29, 30, 52).

Μελέτες Πρόσδεσης του SR-BI σε Λιποπρωτεΐνες

Αρχικές μελέτες πρόσδεσης του SR-BI σε λιποπρωτεΐνες έδειξαν ότι η LDL μπορεί να προσδένεται στον SR-BI με μεγάλη συγγένεια (Kd ~10 nM) (32). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η VLDL (53) και η HDL (13) επίσης προσδένονται με μεγάλη συγγένεια στον SR-BI (53). Η πρόσδεση της HDL στον SR-BI είναι ανεξάρτητη από την παρουσία apoE και ασβεστίου (13). Πριν από αυτή την παρατήρηση, ο μόνος καλά χαρακτηρισμένος, μοριακά, υποδοχέας της LDL ήταν ο κλασικός υποδοχέας της LDL (LDL Receptor) (54, 55). Τέλος, δείχθηκε πρόσφατα ότι ο SR-BI μπορεί να παίζει ρόλο στην αρχική αναγνώριση των χυλομικρών από τα ηπατοκύτταρα και μ'αυτό τον τρόπο να συμβάλλει στη μετέπειτα ενδοκυττάρωση και καταβολισμό τους μέσω του υποδοχέα της LDL (56). Η πρόσδεση, ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση της LDL και πιθανόν και της

τροποποιημένης LDL από τον SR-BI είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με το κλασικό μονοπάτι του LDLR (32, 33). Η ικανότητα του SR-BI να προσδένει διάφορες φυσιολογικές λιποπρωτεΐνες δίνει πιθανή εξήγηση στην ικανότητα ποικίλων κυτταρικών τύπων και ιστών, να προσδένουν πολλαπλές κατηγορίες λιποπρωτεϊνών (57, 58, 59, 60, 61).

Ο SR-BI παρουσιάζει ένα φαινόμενο που ονομάζεται 'μη-αμοιβαίος διασταυρούμενος ανταγωνισμός' (non-reciprocal cross competition). Σ'αυτή την περίπτωση ένας συνδέτης ανταγωνίζεται αποτελεσματικά την πρόσδεση ενός δεύτερου συνδέτη, ενώ το αντίστροφο δεν συμβαίνει (52). Το φαινόμενο αυτό επίσης έχει παρατηρηθεί σε άλλες τάξεις υποδοχέων-καθαριστών (SR) (62, 63). Έτσι έχει βρεθεί ότι η HDL ανταγωνίζεται αποτελεσματικά την πρόσδεση της LDL, ενώ η LDL δεν αναστέλλει την πρόσδεση της HDL (13). Λόγω αυτής της ιδιότητας του SR-BI, πιστεύεται ότι η LDL δεν επηρεάζει σημαντικά την πρόσδεση της HDL στον SR-BI, in vivo.

Διπλές μεταλλάξεις (402Glu→Arg and 418Glu→Arg) στον SR-BI αναστέλλουν σχεδόν εξ'ολοκλήρου την πρόσδεση της HDL στον SR-BI, χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά την πρόσδεση της LDL (52). Επίσης, η μετάλλαξη (158 Met → Arg) αναστέλλει την πρόσδεση τόσο της HDL όσο και της LDL, αλλά όχι της ακετυλιωμένης LDL, στον SR-BI (64). Ο SR-BI προσδένει τη σφαιρική α-HDL καθώς και τη δισκοειδή HDL. Όσο μικρότερη η πυκνότητα των σωματιδίων της α-HDL, τόσο πιο ισχυρά προσδένονται στον SR-BI (65, 66). Ανασυστημένα δισκοειδή σωματίδια φωσφολιπιδίων/ χοληστερόλης / απολιποπρωτεϊνών (δηλ. apoA-I, apoA-II, apoE, ή apoC-III) προσδένονται πιο ισχυρά στον SR-BI από ότι η ενδογενής, σφαιρική α-HDL (67, 68, 65). Η απολιποπρωτεΐνη apoA-I, στερούμενη λιπιδίων και τα σωματίδια της προ-ß-HDL έχουν μικρή συγγένεια για τον SR-BI (65). Η πρόσδεση ανασυστημένων δισκοειδών σωματίων apoA-I (rHDL-A-I) στον SR-BI δεν επηρεάζεται από απαλειφή των απαιτεί είτε τις αμινο-τελικών ή των καρβοξυ-τελικών περιοχών του apoA-I (65). Αυτές (65, 66, 67), καθώς και άλλες (69) παρατηρήσεις αποτελούν ισχυρές παρέχουν ενδείξεις ότι η διαμόρφωση και οργάνωση της apoA-I στα σωμάτια της rHDL επηρεάζει σημαντικά τη φύση των αλληλεπιδράσεων των σωματιδίων αυτών με τον SR-BI. Χρησιμοποιώντας ανασυστημένα φωσφολιπιδικά

λιποσώματα που περιείχαν τμήματα της apoA-I, οι Williams et al. (70) έδειξαν ότι οι αμφιπαθικές έλικες ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση των απολιποπρωτεϊνών στον SR-BI . Το γεγονός αυτό μπορεί και πιθανόν να εξηγεί την ικανότητα του SR-BI να προσδένει ευρεία ποικιλία λιποπρωτεϊνών. Ο SR-BI φαίνεται ότι είναι ικανός να προσδένει μόνο λιπιδιωμένη apoE (ανασυνδυασμένη rHDL που περιέχει apoE). Η περιοχή της apoE που προσδένεται στον υποδοχέα βρίσκεται στο αμινο-τελικό της τμήμα, μεταξύ των αμινοξέων 1 και 165 (68).

Μία μελέτη έδειξε ότι ο εμπλουτισμός της HDL του πλάσματος με apoA-II, αυξάνει τη συγγένειά της με τον SR-BI, αλλά αναστέλλει την πρόσληψη των εστέρων της χοληστερόλης (71). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι ανασυστημένα σωμάτια φωσφολιπιδίων που περιέχουν apoA-I και apoA-II, εμφανίζουν μειωμένη πρόσδεση στον SR-BI, σε σχέση με σωμάτια τα οποία περιέχουν μόνο apoA-I (72).

Β. Μεταφορά Λιπιδίων από τον SR-BI

α. Επιλεκτική Πρόσληψη Χοληστερόλης

Η πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στον SR-BI συμβάλλει στη μεταφορά μιας ποικιλίας λιπιδίων από τος λιποπρωτεΐνες στα κύτταρα. Η μεταφορά αυτή είναι επιλεκτική, υπό την έννοια ότι δεν οδηγεί στην ενδοκυττάρωση και αποδόμηση των λιποπρωτεϊνών (όπως συμβαίνει, π.χ. με την αλληλεπίδραση της LDL με τον υποδοχέα της, LDLR) (13). Αντίθετα, η επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων από τα κύτταρα περιλαμβάνει τη μεταφορά των λιπιδίων από τις λιποπρωτεΐνες στα κύτταρα και την επακόλουθη απελευθέρωση των λιποπρωτεϊνών από τον SR-BI. Αυτό συμβαίνει, για παράδειγμα, κατά την επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων της χοληστερόλης της HDL από τα κύτταρα, που επακολουθεί την πρόσδεση της HDL στον SR-BI (13).

Πλην των εστέρων της χοληστερόλης, ο SR-BI πραγματοποιεί επίσης τη μεταφορά μη-εστεροποιημένης χοληστερόλης (74, 75, 76, 77), φωσφολιπιδίων (78), τριγλυκεριδίων (79), α-τοκοφερόλης (80, 81), DiI (13), BODIPY-εστέρων χοληστερόλης (82),

φωσφολιπιδίων σημασμένων με πυρένια (78) και αιθέρων χοληστερόλης (που χρησιμοποιούνται συχνά ως μη-υδρολυόμενα ανάλογα εστέρων χοληστερόλης (13). Αναλύσεις της μεταφοράς λιπιδίων από ανασυστημένη HDL σε κύτταρα που εκφράζουν SR-BI έδειξαν ότι τα πιό υδρόφοβα λιπίδια (π.χ. η μη-εστεροποιημένη χοληστερόλη, οι εστέρες χοληστερόλης, και τα τριγλυκερίδια) μεταφέρονται ευκολότερα από τα πιό πολικά μόρια φωσφολιπιδίων (83).

Η φυσιολογική σημασία της επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων από τον SR-BI σε κύτταρα σε καλλιέργεια δείχθηκε αρχικά με τη χρήση στεροειδογόνων κυττάρων, τα οποία εκφράζουν υψηλά επίπεδα SR-BI. Τα κύτταρα αυτά προσδένουν την HDL και προσλαμβάνουν επιλεκτικά τους εστέρες χοληστερόλης της HDL, που χρησιμοποιούν για στεροειδογένεση (84). Η σημασία των αλληλεπιδράσεων του SR-BI με την HDL για τη στεροειδογένεση, ενισχύθηκε από πειράματα που έδειξαν ότι ένα αντίσωμα κατά του SR-BI παρεμπόδισε ταυτόχρονα την πρόσδεση της HDL, την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης της HDL, και τη στεροειδογένεση στα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων του ποντικού (84). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν περιγραφεί για τα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών του αρουραίου (85). Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την άποψη ότι ο SR-BI αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό υποδοχέα της HDL. Είναι εντούτοις πιθανό να υπάρχουν επιπλέον υποδοχείς της HDL εκτός του SR-BI στην κυτταρική επιφάνεια, με διαφορετική δομή, ιστική έκφραση και λειτουργική δράση.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης δεν εξαρτάται από μια και μοναδική κατηγορία λιποπρωτεϊνών. Τόσο η HDL (86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104) όσο και ανασυστημένα σωμάτια HDL που παρασκευάζονται με apoA-I, apoC και apoE (105), η IDL (105,106) και η LDL (99, 104, 107, 108, 109, 110) αποτελούν πηγές χοληστερόλης για την επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων in vitro ή/και in vivo.

Έχει ευρεθεί ότι ο SR-BI πραγματοποιεί την επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων της χοληστερόλης από την LDL (76, 110, 111, 112) και την πρόσληψη φθοριζόντων λιπιδίων από την VLDL (53). Παρά ταύτα, η επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων της

χοληστερόλης της LDL είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τη μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης της HDL (113). Σχετικά με την HDL, ευρέθη ότι η επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χολεστερόλης είναι μεγαλύτερη για την LpA-I σε σύγκριση με την LpA-I:A-II (114).

Επιπλέον, ο SR-BI προσδένει το αμυλοειδές Α του ορρού SAA (serum amyloid A), ελεύθερο λιπιδίων και η πρόσδεση αυτή αναστέλλει την πρόσδεση της HDL στον SR-BI και την επιλεκτική πρόσληψης των εστέρων της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Αντίθετα, η SAA ως συστατικό της HDL δεν επηρεάζει την πρόσδεσή της στον SR-BI αλλά αναστέλλει 30-50% της επιλεκτικής πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης από τα κύτταρα (115).

Παρά το γεγονός ότι τόσο ο SR-BI (13, 53) και το ομόλογό του, CD36 (17, 112), προσδένουν την HDL με υψηλή συγγένεια, μόνο ο SR-BI πραγματοποιεί σημαντική επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων (17, 112). Κατά συνέπεια, η πρόσδεση της HDL στην επιφάνεια των κυττάρων δεν επαρκεί για την επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων. Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι η ενδοκυττάρωση των HDL και LDL δεν είναι απαραίτητη για την επιλεκτική πρόσληψη των λιπιδίων τους (116).

Ανάλυση χιμαιρικών πρωτεϊνών που περιέχουν συγκεκριμένες περιοχές των SR-BI και CD36 έδειξε ότι αλληλουχίες της εξωκυττάριας περιοχής του SR-BI σε συνδυασμό με τις κυτταροπλασματικές και διαμεμβρανικές περιοχές της CD36, συμβάλλουν στην αποδοτική επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων (17, 112). Σημαντικό ρόλο στην αποδοτικότητα της επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων παίζει η καρβοξυτερματική κυτταροπλασματική περιοχή του SR-BI. Έχει ευρεθεί ότι ο SR-BII, που έχει διαφορετική καρβοξυ-τελική κυτταροπλασματική περιοχή, πραγματοποιεί την επιλεκτική πρόσληψη λιγότερο αποτελεσματικά από τον SR-BI (18). Επίσης, έχουν βρεθεί σημειακές μεταλλάξεις (όπως η Gly420His), οι οποίες οδηγούν σε αναστολή της επιλεκτικής πρόσληψης των εστέρων της χοληστερόλης από την HDL και της επακόλουθης υδρόλυσής του, παρόλο που δεν επηρεάζουν την πρόσδεση της HDL (117).

Οι λεπτομέρειες των μοριακών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην HDL και τον SR-BI, που οδηγούν στην έξοδο χοληστερόλης από το κύτταρο, παραμένουν άγνωστες. Διάφορες μελέτες επίσης υποδεικνύουν ότι ενδέχεται να υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί την ύπαρξη πρόσθετων μηχανισμών επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων, π.χ. μέσω πρωτεογλυκανών της κυτταρικής επιφάνειας (118, 119). Η ανακάλυψη χημικών αναστολέων της επιλεκτικής μεταφοράς λιπιδίων μέσω του SR-BI, καθώς και η εύρεση και μελέτη της κρυσταλλικής δομής του SR-BI, αναμένεται να δώσουν νέες πληροφορίες σχετικά με την πρόσδεση της HDL στον SR-BI και την μεταφορά εστέρων χοληστερόλης στο κύτταρο (120, 121).

- **Ρόλος των Καβεολίων στην Επιλεκτική Πρόσληψη Λιπιδίων**

Όπως εξειδικευμένες περιοχές στην πλασματική μεμβράνη που ονομάζονται καλυμμένα κυστίδια κλαθρίνης (clathrin-coated pits) απαιτούνται για την ενδοκύτωση της LDL από τον LDLR (54, 91), έχει προταθεί ότι εξειδικευμένες δομές της κυτταρικής επιφάνειας που ονομάζονται καβεόλια (caveolae) και που περιέχουν την πρωτεΐνη καβεολίνη (122), συμβάλλουν στην επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων από τον SR-BI (17, 123). Υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων, ο SR-BI εντοπίζεται στα καβεόλια της κυτταρικής επιφάνειας (15, 18). Αυτό υποδεικνύει ότι αυτές οι περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να είναι σημαντικές για την εξαρτώμενη από τον SR-BI μεταφορά χοληστερόλης μεταξύ των λιποπρωτεϊνών και των κυττάρων (15). Έχει προταθεί ότι ο SR-BI σταθεροποιεί την πρωτεΐνη καβεολίνη-1 (caveolin-1) σε κυτταροκαλλιέργειες, ανεξάρτητα από το μεταγραφικό του έλεγχο (124). Επιπλέον, η επιλεκτική πρόσληψη σε ορισμένα κύτταρα φαίνεται να συσχετίζεται με τα επίπεδα της καβεολίνης-1 (caveolin-1) (122), η οποία προσδένει χοληστερόλη (125). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η καβεολίνη-1 (caveolin-1) ρυθμίζει αρνητικά ή δεν επηρεάζει την εξαρτώμενη από τον SR-BI επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων χοληστερόλης της HDL (126). Η καβεολίνη (caveolin) έχει επίσης συσχετιστεί με την ενδοκυττάρια μεταφορά χοληστερόλης (127, 128). Μια μελέτη προτείνει ότι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα που περιλαμβάνει την καβεολίνη-1 (caveolin-1) μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης από την επιφάνεια του κυττάρου, μέσω του SR-BI, σε ενδοκυτταρικά

διαμερίσματα (129). Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι ο εντοπισμός του SR-BI στα καβεόλια (caveolae) ή σε περιοχές με παρόμοια δομή δεν είναι απαραίτητος για την επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης (130).

Στα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων του ποντικού, ο SR-BI βρέθηκε σε πολυάριθμες κυκλικές και ωοειδείς δομές της κυτταρικής επιφάνειας που φαίνεται να αντιπροσωπεύουν δομές μεσοκυττάριων καναλιών, πλούσιων σε μικρολάχνες (131, 132, 133, 134). Τα κανάλια αυτά ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων (82, 131, 132, 133, 134). In vivo πειράματα επίσης έδειξαν ότι ο SR-BI εντοπίζεται σε κανάλια μικρολαχνών (100, 85), επάγει το σχηματισμό καναλιών μικρολαχνών όταν υπερεκφράζεται σε κύτταρα εντόμων (82) και συμμετέχει στο σχηματισμό καναλιών μικρολαχνών σε στεροειδογόνα κύτταρα του ποντικού (135). Δεν είναι ακόμη γνωστό εάν η επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων από την HDL λαμβάνει χώρα στην κυτταρική επιφάνεια ή σε κάποιο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα και ακολουθείται από ανάδρομη ενδοκύτωση (retrograde endocytosis) των σωματιδίων λιποπρωτεϊνών που έχουν χάσει μέρος των αρχικών λιπιδίων τους (lipid-depleted) (29, 30, 31, 99, 100, 23, 85, 131, 132, 133, 136). Μελέτες στις οποίες απομονωμένος SR-BI ανασυστήθηκε σε λιποσώματα φωσφατιδυλχολίνης και χοληστερόλης έδειξαν ότι τα λιποσώματα που περιέχουν SR-BI έχουν την ικανότητα πρόσδεσης της HDL και της επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων. Αυτό φανερώνει ότι η πρόσδεση της HDL και η επιλεκτική πρόσδεση εστέρων χοληστερόλης μέσω του SR-BI δεν απαιτεί τη συμμετοχή άλλων πρωτεϊνών ή εξειδικευμένων κυτταρικών δομών ή διαμερισμάτων (137). Η αρχική μελέτη επιβεβαιώθηκε με λεπτομερείς μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής (βλέπε «Αποτελέσματα»).

- **Ρόλος Λιπασών και Πρωτεϊνών Μεταφοράς Λιπιδίων του Πλάσματος στη Λειτουργία του SR-BI**

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η ηπατική λιπάση μπορεί να συμμετέχει στο μεταβολισμό HDL μέσω διαφόρων μηχανισμών (138, 139), ένας εκ των οποίων είναι η επιλεκτική πρόσληψη της χοληστερόλης της HDL (29, 30, 31). Έχει προταθεί ότι η ηπατική λιπάση

και ο SR-BI μπορεί να δρουν συνεργιακά για την αποδοτική επιλεκτική μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης από την HDL στα κύτταρα (29, 30, 31, 138, 140, 141, 142). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται σε διάφορες παρατηρήσεις και πειραματικά δεδομένα. Έτσι, έχει ευρεθεί ότι η δράση της ηπατικής λιπάσης διευκολύνει την επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων της χοληστερόλης της HDL μέσω του SR-BI από τα κύτταρα (143, 144), επίσης ότι η ηπατική λιπάση (145, 146) εκφράζεται σε υψηλότερο βαθμό στους ιστούς που έχουν τα υψηλότερα ποσοστά μεταφοράς HDL-χοληστερόλης μέσω επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων. Παράλληλα ότι η έκφραση του SR-BI από τα επινεφρίδια είναι αυξημένη σε KO ποντίκια για την ηπατική λιπάση (140) καθώς και σε αρουραίους που έχουν ενεθεί με αντίσωμα που αναγνωρίζει την ηπατική λιπάση (147) και 4). Επίσης σε ποντίκια με διπλή απαλειφή (KO) για την apoE και την ηπατική λιπάση, σχηματίζονται ασυνήθιστες κυστοειδείς (vesicular) λιποπρωτεΐνες (142). Η συνεργειακή δράση της ηπατικής λιπάσης στην επιλεκτική πρόσληψη της χοληστερόλης της HDL μέσω του SR-BI εξαρτάται τόσο από τη λιπολυτική όσο και από τη μη-λιπολυτική δράση της ηπατικής λιπάσης (143). Η αναδιαμόρφωση της HDL από την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP), σε συνάρτηση με την τροποποίησή της από την ηπατική λιπάση, ενδέχεται να ενισχύει την επιλεκτική πρόσληψη της χοληστερόλης της HDL από τα κύτταρα μέσω του SR-BI (144, 148). Τόσο η in vitro όσο και η in vivo επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων της χοληστερόλης από τον SR-BI αυξάνεται μετά από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της HDL από την εκκρινόμενη φωσφολιπάση Α2 (ομάδας IIa) (149, 150). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων από τα κύτταρα μέσω του SR-BI είναι η περιεκτικότητα της HDL σε τριγλυκερίδια. HDL με υψηλή περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια μειώνει την ικανότητα του SR-BI να προσλαμβάνει επιλεκτικά τους εστέρες της χοληστερόλης από την HDL. Η παρατηρήσεις αυτές φανερώνουν τη σημασία της ενζυμικής τροποποίησης των λιπιδίων της HDL μέσω των λιπασών της LCAT ή του CETP για την αποτελεσματική μεταφορά εστέρων χοληστερόλης στα κύτταρα μέσω του SR-BI (108, 144, 148, 149, 150). Παράλληλα, η εξαρτώμενη από την LCAT αναδιαμόρφωση της HDL είναι επίσης σημαντική για την αποτελεσματική επιλεκτική πρόσληψη των εστέρων της χοληστερόλης της HDL από τον SR-BI (151). Συνολικά, αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι ο μεταβολισμός της χοληστερόλης της HDL μέσω του μονοπατιού του SR-BI μπορεί

να εξαρτάται από σύνθετες μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων ενζύμων ή πρωτεϊνών μεταφοράς λιπιδίων που συμβάλλουν στη βιογένεση, αναδιαμόρφωση και καταβολισμό της HDL.

- **Ενδοκυτάρια Μεταφορά των Λιπιδίων της HDL και Υδρόλυση των Εστέρων Χοληστερόλης**

Οι μηχανισμοί της πιθανής ενδοκυττάριας μεταφοράς των λιπιδίων της HDL που προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω του SR-BI παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι (97). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένες πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, οι πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην ακεραιότητα της συσκευής Golgi, και κάποιες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, δεν απαιτούνται για την ενδοκυτταρική κυκλοφορία της χοληστερόλης που προέρχεται από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος μέσω επιλεκτικής πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης από τον SR-BI. Η ενδοκυττάρια μεταφορά των λιπιδίων της HDL φαίνεται να απαιτεί ενέργεια και να επιτελείται από άγνωστες πρωτεΐνες ευαίσθητες στη N-εθυλμαλεϊμίδη (97). Ένα σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες καβεολίνη (caveolin) και ανεχίνη II (annexin II) μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να συμμετέχει στη μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης που προέρχονται από τον SR-BI, από την κυτταρική μεμβράνη στον ενδοκυττάριο χώρο (129). Ο ρόλος της ηπατικής υδρολάσης των ουδέτερων εστέρων της χοληστερόλης καθώς επίσης και πλούσιων σε χοληστερόλη κύστιδίων-μεταφορέων ή πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (129) στον έλεγχο της διαθεσιμότητας και της κυκλοφορίας της χοληστερόλης που προέρχεται από την πρόσληψη των εστέρων της χοληστερόλης της HDL από τον SR-BI, δεν έχει μελετηθεί. Στη υδρόλυση των εστέρων της χοληστερόλης που μεταφέρονται από την HDL στα κύτταρα μέσω του SR-BI, ενέχονται ιστο-ειδικές υδρολάσες ουδέτερων εστέρων χοληστερόλης (152). Επιπλέον, η CLAMP επηρεάζει την αποδοτικότητα της ενδοκυττάριας υδρόλυσης των εστέρων της χοληστερόλης της HDL που προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω του SR-BI (27).

Ρόλος του SR-BI στην Κυτταρική Έξοδο Χοληστερόλης

Η ανακάλυψη της ικανότητας του SR-BI να προκαλεί επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων ήγειρε το ερώτημα εάν ο SR-BI μπορεί να συμβάλλει στην αντίστροφη διαδικασία δηλ. τη μεταφορά της ελεύθερης χοληστερόλης από κύτταρα στους κατάλληλους αποδέκτες της στον εξωκυττάριο χώρο (29, 19). Η ικανότητα του SR-BI να πραγματοποιεί την κυτταρική έξοδο χοληστερόλης δείχθηκε σε μελέτες καλλιέργειας κυττάρων διαμολυσμένων με SR-BI (74, 75). Οι μελέτες αυτές έδειξαν αυξημένη μεταφορά μη-εστεροποιημένης ραδιοσημασμένης χοληστερόλης από τα κύτταρα στην HDL, σε ανασυστημένα σωμάτια rHDL και σε λιποσώματα φωσφατιδυλχολίνης, αλλά όχι σε apoA-I ελεύθερη λιπιδίων (75, 153). Πρόσφατες μελέτες επίσης έδειξαν ότι ο SR-BI ενεργοποιεί την έξοδο χοληστερόλης από κύτταρα σε λιποσώματα που περιέχουν apoE και ότι τα αμινοξέα 1-165 της αμινοτελικής περιοχής της apoE επαρκούν για την πρόσδεση της apoE στον SR-BI και την έξοδο της χοληστερόλης από το κύτταρο (154). Η μεταφορα από τον SR-BI, μη-εστεροποιημένης χοληστερόλης μεταξύ κυττάρων και HDL είναι αμφίδρομος (150). Επειδή η δράση του SR-BI δεν εξαρτάται από την υδρόλυση του ATP, η μεταφορά λιπιδίων φαίνεται να καθορίζεται από τη διαφορά της συγκέντρωσής τους ανάμεσα στα κύτταρα και στους εξωκυττάριους αποδέκτες των λιπιδίων.

Σε όλες τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έως τώρα, η εξαρτώμενη από τον SR-BI κυτταρική έξοδος χοληστερόλης έχει συσχετιστεί με την ικανότητα του υποδοχέα αυτού να πραγματοποιεί επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων από τα κύτταρα (64, 155). Αυτό φανερώνει ότι οι μηχανισμοί κυτταρικής εισόδου και εξόδου της χοληστερόλης μπορεί να συνδέονται. Ανάλυση μεταλλαγμένων μορφών του SR-BI που έχουν χάσει την ικανότητα να προσδένουν και να πραγματοποιούν επιλεκτική πρόσληψη είτε μόνο από την HDL ή από την HDL και LDL (αλλά όχι από την ακυλιωμένη LDL), δείχνουν ότι η πρόσδεση λιποπρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα μέσω του SR-BI. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από άλλες μελέτες που έδειξαν ότι η κυτταρική έξοδος χοληστερόλης αναστέλλεται από αντισώματα που εμποδίζουν την πρόσδεση της HDL στον SR-BI (64). Ανάλυση της αλληλεπίδρασης δισκοειδών σωματίων HDL που περιλαμβάνουν αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές apoA-I, με αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές του SR-BI έδειξαν ότι, όπως συμβαίνει με τις

αλληλεπιδράσεις ενζύμων-υποστρωμάτων, είναι αναγκαίο να υπάρξει παραγωγική πρόσδεση (productive binding) ενός μορίου HDL στον SR-BI, προκειμένου να γίνει αποδοτική μεταφορά λιπιδίων από την HDL έξοδος χοληστερόλης από τα κύτταρα (69) Η παρεμπόδιση της μεσολαβούμενης από τον SR-BI επιλεκτικής πρόσληψης λιπιδίων από τον SR-BI με τη χρήση μικρών μορίων (αναστολείς της μεταφοράς λιπιδίων), που απομονώθηκαν με ανίχνευση μιας βιβλιοθήκης χημικών ενώσεων υποστηρίζει επίσης ένα μηχανισμό που συνεπάγεται σύνδεση της HDL στον SR-BI και επακόλουθη για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά λιπιδίων (121). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι HDL που απεμονώθη από ποντίκια με ανεπάρκεια της apoA-I προσδένεται με υψηλή συγγένεια στον SR-BI, αλλά δεν προσφέρεται για αποδοτική επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η έκφραση του SR-BI σε καλλιέργειες κυττάρων μεταβάλλει τη διαθεσιμότητα της κυτταρικής χοληστερόλης που μπορεί να τροποποιηθεί από την οξειδάση της χοληστερόλης (156, 157). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις είχε προταθεί ότι η πρόσδεση της HDL στον SR-BI δεν απαιτείται για την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα (156, 157).

Η κυτταρική έξοδος χοληστερόλης μέσω του SR-BI επηρεάζεται από ενζυμικές και μη-ενζυμικές αλλαγές στη λιπιδική σύσταση και τους διαφόρους υποπληθυσμούς της HDL (150). Η νόσος Tangier, που οδηγεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα HDL στο πλάσμα, χαρακτηρίζεται από βλάβη στην έξοδο χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα σε μόρια-αποδέκτες, όπως είναι η apoA-I φτωχή σε λιπίδια ή χωρίς λιπίδια,. Πρόσφατα, με μεθόδους αντίστροφης γενετικής ευρέθη ότι η νόσος Tangier οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί τον μεταφορέα ABCA1 (158, 159, 160, 161). Έχει ευρεθεί ότι εμπλουτισμός της HDL σε φωσφατιδυλχολίνη ή σε σφιγγομυελίνη αυξάνει την έξοδο χοληστερόλης σε καλλιέργειες κυττάρων που εκφράζουν τον SR-BI. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με το πρηνές χοληστερόλης ανάμεσα στα σωμάτια της HDL και στην κυτταρική μεμβράνη (59, 162). Τέλος, δείχθηκε ότι το αμυλοειδές Α του ορρού αυξάνει την κυτταρική έξοδο χοληστερόλης μέσω του SR-BI (163).

Είναι πιθανό οι SR-BI και ABCA1 να συμβάλλουν συνεργιακά στην έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα. Σ'ένα τέτοιο μονοπάτι, τα σωμάτια HDL που

σχηματίζονται με τη μεταφορά φωσφολιπιδίων στην ελεύθερη λιπιδίων apoA-I με τη δράση του ABCA1 (164, 165, 166), γίνονται οι αποδέκτες στην επακόλουθη έξοδο χοληστερόλης μέσω της δράσης του SR-BI. Συνδέτης του ABCA1 είναι apoA-I ελεύθερη λιπιδίων (165, 166, 167, 168), ενώ συνδέτης του SR-BI (65, 66, 67), είναι η HDL. Μια μελέτη διαμόλυνσης κυττάρων με πλασμίδια που εκφράζουν τον SR-BI και τον ABCA1 έδειξε ότι οι SR-BI και ABCA1 μπορεί να έχουν διακριτές και, σε κάποιες περιπτώσεις, αντίθετες δράσεις στη μεταφορά μη-εστεροποιημένης χοληστερόλης από τα κύτταρα στην HDL (169). Πάντως στα μακροφάγα, δείχθηκε πρόσφατα ότι ο ρόλος του SR-BI στην κυτταρική έξοδο χοληστερόλης είναι δευτερεύων (9%), σε σχέση με αυτόν του ABCA1 (170).

6. Κρυστάλλωση του SR-BI

Όπως φάνηκε από τα παραπάνω, ο ρόλος του SR-BI στη φυσιολογία των ανώτερων οργανισμών είναι σημαντικός, αλλά οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη δράση του, καθώς και η σχέση της δομής και της λειτουργίας του, δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί. Πρόσφατες μελέτες μεταφοράς ενέργειας φθορισμού μέσω συντονισμού (fluorescence resonance energy transfer studies) έδειξαν ότι ο SR-BI μπορεί να ομοδιμερίζεται μέσω της καρβοξυ-τελικής του περιοχής (171) ή να σχηματίζει δομές ακόμη υψηλότερης τάξης, όπως τετραμερή (172). Η εύρεση και μελέτη της κρυσταλλικής δομής του SR-BI θα μπορούσαν να συμβάλλουν καθοριστικά στη διαλεύκανση της σχέσης δομής και λειτουργίας του SR-BI. Προκειμένου, όμως να πραγματοποιηθούν δοκιμές κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης, θεωρείται απαραίτητο η πρωτεΐνη αυτή να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιογενής. Στην περίπτωση του SR-BI, το μεγαλύτερο εμπόδιο για την επίτευξη ομοιογένειας είναι η γλυκοζυλίωσή του. Όπως περιεγράφη στην «Εισαγωγή», ο SR-BI παρουσιάζει εκτεταμένη N-γλυκοζυλίωση και μεγάλο μέρος των N-γλυκανών που περιλαμβάνει έχουν χαρακτηριστεί ως σύνθετες, οι οποίες είναι γενικά, εξαιρετικά ετερογενείς. Η ύπαρξη των συμπλόκων ετερόλογων N-γλυκανών δεν είναι συμβατή με την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης. Από την άλλη πλευρά, κάποιος βαθμός περιορισμένης και ομοιογενούς γλυκοζυλίωσης είναι απαραίτητος για τη σταθεροποίηση της δομής της πρωτεΐνης και συνεπώς, για την κρυστάλλωσή της.

Επομένως, ήταν ανάγκη να δημιουργηθεί ένα σύστημα έκφρασης στο οποίο ο σχηματισμός N-γλυκανών του SR-BI να είναι περιορισμένος και ομοιογενής. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά HEK293S μεταλλαγμένη ως προς την παραγωγή N-γλυκανών. Τέτοιες κυτταρικές σειρές μπορούν να κατασκευαστούν αν εκμεταλλευθεί κανείς την αντίστασή τους στις λεκτίνες. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζει συγκεκριμένα αντίσταση στη λεκτίνη ρισίνη (Ricin) και έχει χαρακτηριστεί αρνητική για τη δράση του γονιδίου N-acetyl-glucosaminyltransferase I (GnTI), το οποίο συμμετέχει στην παραγωγή των συμπλόκων N-γλυκανών. Απουσία αυτού του ενζύμου, οι προκύπτοντες N-ολιγοσακχαρίτες έχουν όλοι τη δομή (Man)5(GlcNAc)2 και επομένως η γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης είναι περιορισμένη και ομοιογενής.

Εκτός όμως από την ομοιογένεια, προκειμένου να πραγματοποιηθούν δοκιμές κρυστάλλωσης, απαιτούνται μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης, της τάξεως των δεκάδων χιλιοστογραμμαρίων. Για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης, είναι απαραίτητο να έχουμε ένα αποτελεσματικό σύστημα έκφρασης. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε μια σταθερή κυτταρική σειρά που προέκυψε από εμβρυικά κύτταρα του νεφρού HEK293S (HEK: Human Embryonic Kidney) που καλλιεργήθηκε σε αιώρημα (Suspension) και οδήγησε σε υψηλού επιπέδου έκφραση του SR-BI. Τα κύτταρα HEK293S είναι τροποποιημένα έτσι ώστε να προσφέρονται για μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες σε αιώρημα (suspension cultures). Αυτή η κυτταρική σειρά μπορεί επίσης να πραγματοποιεί πολύπλοκες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ύψιστης σημασίας, ιδιαίτερα όταν αυτές οι τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση, είναι απαραίτητες για τη βιολογική δράση της πρωτεΐνης. Έτσι, από αυτή την κυτταρική σειρά μπορούμε να αναμένουμε λειτουργικές, ορθά αναδιπλωμένες, ετερόλογες πρωτεΐνες σε υψηλά επίπεδα.

Η πραγματοποίηση καλλιεργειών σε αιώρημα της κυτταρικής σειράς HEK293S αγρίου τύπου που εκφράζει τον SR-BI επιχειρήθηκε στο παρελθόν αλλά με μικρή επιτυχία, λόγω συσσωμάτωσης των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται πιθανώς στη μεμβρανική εντόπιση του SR-BI-t1 και στην ιδιάζουσα προβλεπόμενη δομή και τοπολογία του, η

οποία χαρακτηρίζεται από μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, όπως περιεγράφη στην «Εισαγωγή». Η συσσωμάτωση των κυττάρων δυσχεραίνει προφανώς την τροφοδότηση αυτών που βρίσκονται στον «πυρήνα» των συσσωματωμάτων με θρεπτικά συστατικά και περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Επομένως η κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας περιορίζεται και η περιεκτικότητά της σε SR-BI, είναι μικρή. Για το λόγο αυτό, ακολουθήθηκε μια στρατηγική η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε βακτηριακά συστήματα πρωτεϊνικής έκφρασης, κατά την οποία, μεμβρανικές πρωτεΐνες τοξικές για τα βακτηριακά κύτταρα, εκφράζονται με επαγωγή των αντίστοιχων γονιδίων με χρήση συστημάτων επαγώμενης έκφρασης (Tet-ON η΄Tet-Off) , μόνο μετά από επίτευξη σχεδόν μέγιστης κυτταρικής πυκνότητας, όπως εξηγείται κατωτέρω.

Η ανάλυση και ο καθαρισμός του αρχικού πρωτεϊνικού δείγματος SR-BI με χρήση χρωματογραφίας συγγενείας και εν συνεχεία με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής έδωσε καθαρό παρασκεύασμα SR-BI που έπρεπε να συμπυκνωθεί σε όγκο πρωτεϊνικού δείγματος περίπου 200μl-300μl και συγκέντρωσης 1-2mg/ml για κάθε ανάλυση. Ήταν αναγκαίο να γίνουν πολλές τέτοιες αναλύσεις προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες παρασκευής καθαρής, ομοιογενούς και σταθερής πρωτεΐνης, καθώς και πολλές δοκιμές κρυστάλλωσης, υπό διαφορετικές συνθήκες, έως ότου επιτευχθεί παραγωγή κρυστάλλων καλής ποιότητας και ικανού μεγέθους.

Α. Το Σύστημα Επαγώμενης Έκφρασης Πρωτεϊνών TET-ON που Εχρησιμοποιήθη για τη Μεγιστοποίηση της Έκφρασης του SR-BI σε Καλλιέργεια Κυττάρων σε Βιοαντιδραστήρα

Συστήματα γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών, που ρυθμίζονται από την τετρακυκλίνη, περιεγράφησαν για πρώτη φορά από τους Gossen και Bujard (173). Μέσω της συνένωσης του βακτηριακού καταστολέα tet (TetR) με την περιοχή (domain) ενεργοποίησης της ιικής πρωτεΐνης 16 (viral protein 16, VP-16), κατασκευάστηκε μια πρωτεΐνη - δια-ενεργοποιητής (transactivator). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται ιδιοσυστασιακά (constitutively) σε κύτταρα HeLa και προσδένεται σε αλληλουχίες tet

operator (tetO) ενσωματωμένες στον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Η πρόσδεση του διαενεργοποιητή (transactivator) εμποδίζει την έκφραση του επιθυμητού γονιδίου που είναι κλωνοποιημένο πιο κάτω από τον υποκινητή του CMV. Η προσθήκη τετρακυκλίνης εκτοπίζει την πρωτεΐνη - δια-ενεργοποιητή και επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου της επιλογής μας. Το επαγώμενο αυτό σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη γονιδιακή έκφραση σε διάφορα συστήματα.

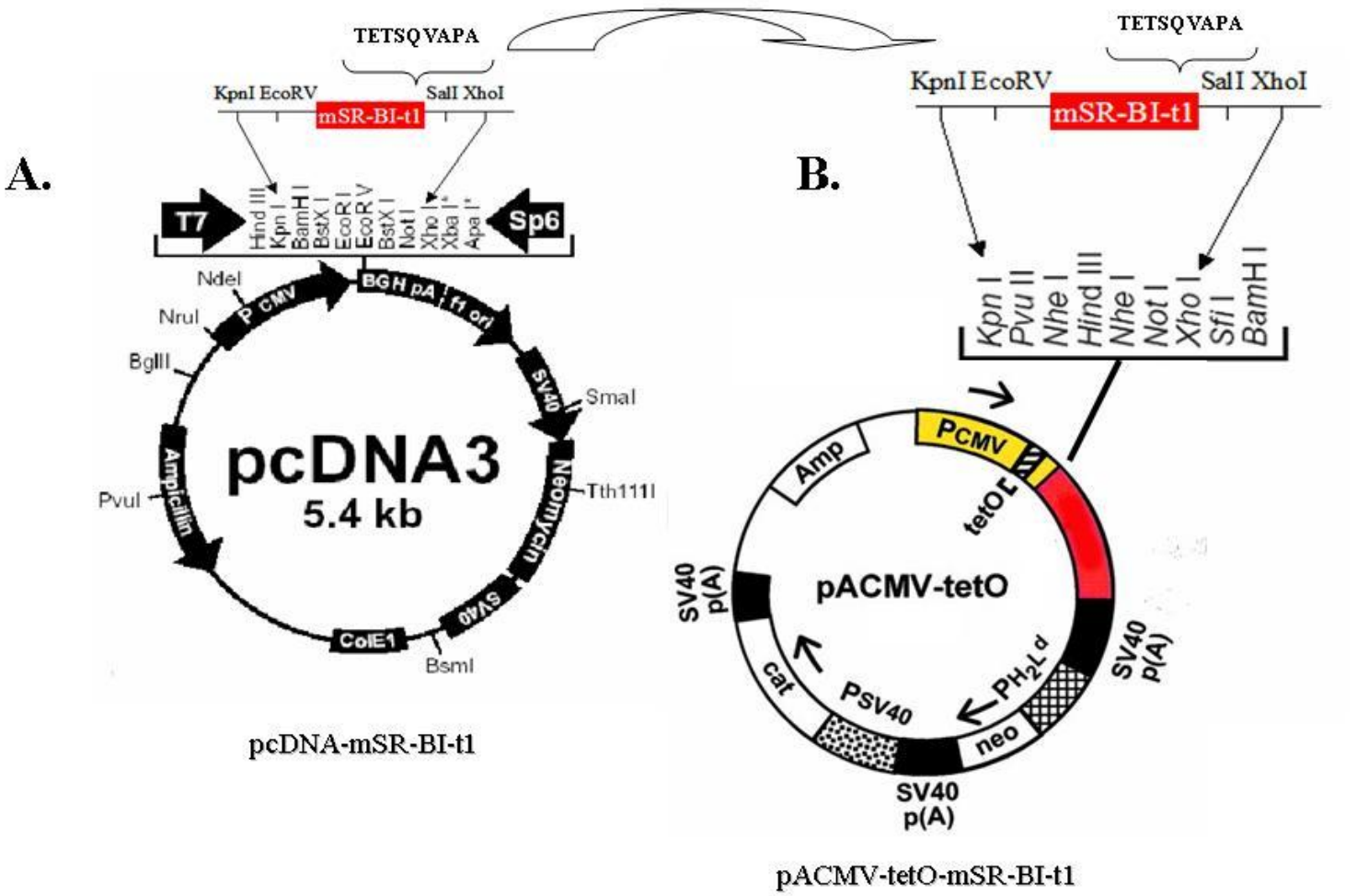
Πιο πρόσφατα, οι Yao et al. (174) κατασκεύασαν ένα εναλλακτικό σύστημα έκφρασης επίσης επαγώμενο από την τετρακυκλίνη, που βασίζεται στην καταστολή από μόνη την πρωτεΐνη TetR. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί έναν πλήρους μήκους υποκινητή CMV που περιλαμβάνει δύο επάλληλες αλληλουχίες tetO. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το δεύτερο σύστημα, το οποίο χρειάζεται επιπλέον την προσθήκη βουτυρικού νατρίου, σε καλλιέργειες οι οποίες βρίσκονται σε φάση αναπτυξιακού κορεσμού (growth-saturated), προκειμένου να επιτευχθεί μέγιστη γονιδιακή έκφραση. Το βουτυρικό νάτριο είναι αναστολέας της αποακετυλάσης των ιστονών και δρα, κατά πάσα πιθανότητα, διατηρώντας την ακυλίωση των ιστονών, που ευνοεί τη γονιδιακή έκφραση (175). Μελέτες in vitro έχουν δείξει ότι, όταν το DNA του υποκινητή οργανώνεται σε νουκλεόσωμα με μη-ακετυλιωμένες ιστόνες, οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες δεν μπορούν να προσδεθούν στο TATA box και στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής (176). Στις μη-ακετυλιωμένες ιστόνες, οι αμινο-τελικές λυσίνες είναι θετικά φορτισμένες και αλληλεπιδρούν ισχυρά με τις φωσφορικές ομάδες του DNA, εμποδίζοντας την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων. Επίσης, οι μη-ακετυλιωμένες ιστόνες αλληλεπιδρούν με τα γειτονικά οκταμερή των ιστονών, ευνοώντας έτσι την αναδίπλωση της χρωματίνης σε συμπυκνωμένες δομές υψηλότερης τάξης, των οποίων η ακριβής στερεοδιαμόρφωση δεν είναι κατανοητή.

Β. Χρήση Συστήματος Χρωματογραφίας Ανοσοσυγγενείας για τον Καθαρισμό του SR-BI

Η χρησιμοποίηση του συστήματος Tet-On, που επιτρέπει την επαγώμενη έκφραση του SR-BI μετά από προσθήκη τετρακυκλίνης στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των

κυττάρων HEK293S, επέτρεψε την υπερέκφραση του SR-BI στην κυτταρική καλλιέργεια του βιοαντιδραστήρα και τον καθαρισμό του με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας. Για το σκοπό αυτό εχρησιμοποιήθη στήλη χρωματογραφίας Sepharose 4-B στην οποία είχαν συνδεθεί ομοιοπολικά, αντισώματα κατά του επιτόπου TETSQVAPA της ροδοψίνης (1D4). Το αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των αντισωμάτων (1D4) είναι ένας πεπτιδικός επίτοπος (t1: TETSQVAPA) που έχει προστεθεί στο καρβοξυ-τελικό άκρο του SR-BI. Ο πεπτιδικός αυτός επίτοπος αντιστοιχεί στα καρβοξυτελικά εννέα αμινοξέα της πρωτεΐνης ροδοψίνης (Εικ. 4).

Κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας, ο SR-BI, μέσω του πεπτιδικού του επιτόπου t1, προσεδέθη ανιστρεπτά στα αντισώματα 1D4 της στήλης ανοσοσυγγενείας. Για την έκλουση του SR-BI, η στήλη επλύθη πέντε φορές με διάλυμα πλύσης και τέλος, προσετέθη στη στήλη το διάλυμα έκλουσης. Το διάλυμα αυτό περιελάμβανε το εννεαπεπτίδιο t1, το οποίο ανταγωνίζεται τον επίτοπο t1 του SR-BI-t1 για την πρόσδεση στο 1D4. Έτσι, το διάλυμα έκλουσης που συλλέγεται, περιέχει τον SR-BI και το πεπτίδιο t1, που εν συνεχεία απομακρύνεται κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης και με διάλυση του μείγματος. Εναλλακτικά, η πρόσδεση μπορεί να επιτευχθεί με τη μέθοδο της εκχύλισης (batch extraction), κατά την οποία το αρχικό κυτταρικό εκχύλισμα προστίθεται στη στερεή φάση σε αιώρημα και ακολουθεί προσθήκη του t1 επιτόπου, ανάδευση του μείγματος, διαχωρισμός της στερεής φάσης από την υγρή (με φυγοκέντρηση, για παράδειγμα), νέα έκλουση παρουσία του t1 και επαναφυγοκέντρηση/διαχωρισμός της στερεής φάσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5 φορές. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε μια υβριδική μέθοδος, κατά την οποία η πρόσδεση της πρωτεΐνης έγινε αρχικά με τη μέθοδο της εκχύλισης (batch extraction). Στη συνέχεια η στερεή φάση με προσδεδεμένο το μόριο-στόχο, επακεταρίσθη σε στήλη και οι πλύσεις και οι εκλούσεις που ακολούθησαν, έγιναν στη στήλη. Έτσι, παρήχθησαν τελικά δεκάδες χιλιοστογραμμαρίων εξαιρετικά ομοιογενούς και καθαρού υποδοχέα, που χρησίμευσαν για δοκιμασίες κρυστάλλωσης και μελέτη της πρόσδεσης της HDL και LDL και της πρόσληψης αιθέρων χοληστερόλης, σε λιποσώματα ανασυστημένα με τον καθαρισμένο υποδοχέα SR-BI.



Εικ. 4. Κατασκευή του Πλασμιδίου pACMV-tetO-mSR-BI-t1 για την Επαγωμένη Έκφραση του mSR-BI-t1. Το t1 είναι ένας Πεπτιδικός Επίτοπος 10 Αμινοξέων (TETSQVAPA) που Αντιστοιχεί στο Καρβοξυ-τελικό Άκρο της Πρωτεΐνης Ροδοψίνης

7. Ρόλος του SR-BI In Vivo

Ο SR-BI, λόγω της δράσης του στην πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στα κύτταρα, καθώς και στην πρόσληψη και την έξοδό τους από αυτά, πιστεύεται ότι συμβάλλει in vivo στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα και άλλα κύτταρα του τοιχώματος των στεφανιαίων αγγείων (177). Επίσης ο SR-BI συμμετέχει σε σηματοδοτικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην ακεραιότητα και καλή λειτουργία του ενδοθηλίου (178).

Η σημασία του φαινομένου αυτού στην παθοφυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος είναι μεγάλη, καθώς σχετίζεται αιτιακά με την αθηροσκλήρωση των στεφανιαίων αγγείων, που είναι σημαντική πηγή νοσηρότητας και θνησιμότητας στον ανεπτυγμένο κόσμο (177). Πειράματα που έγιναν σε ποντίκια με ταυτόχρονη έλλειψη του SR-BI και της apoE (SR-BI και apoE double knockout mice, dKO) έδειξαν ότι αυτή η έλλειψη οδηγεί στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης και στον πρόωρο θάνατο των ποντικών, ενώ ιστοπαθολογική ανάλυση αυτών αποκαλύπτει βαρειές ισχαιμικές αλλοιώσεις και καρδιακή υπερτροφία (179-184). Αντιθέτως, η υπερέκφραση του SR-BI στο ήπαρ μειώνει τη βαρύτητα της αθηρωμάτωσης (185).

Ο SR-BI ενδέχεται να ασκεί αντιαθηρογόνο δράση μέσω και άλλων ιδιοτήτων που παρουσιάζει, όπως η αναστολή της οξείδωσης της LDL, [καθώς είναι γνωστό ότι η οξειδωμένη LDL είναι κυτταροτοξική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα (186)], η συμμετοχή του στο μεταβολισμό της βιταμίνης Ε, που είναι αθηροπροστατευτική (187, 188, 189) και η ενεργοποίηση της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου των ενδοθηλιακών κυττάρων (190, 191, 192). Ειδικά για την ενεργοποίηση της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου, δείχθηκε πρόσφατα ότι αυτή επιτελείται από τον SR-BI μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη Src και απαιτεί επιπλέον την πρωτεΐνη PDZK1, η οποία αλληλεπιδρά με τον SR-BI μέσω της καρβοξυτερματικής του περιοχής (193, 194). Στο φαινόμενο της αθηροσκλήρωσης συμμετέχουν και τα μακροφάγα. Έτσι, με πειράματα μεταμόσχευσης μυελού των οστών σε ποντικούς φάνηκε ότι ή έλλειψη του SR-BI στα μακροφάγα, προάγει το σχηματισμό πρώιμων αθηρωματικών αλλοιώσεων,

αλλά προστατεύει από το σχηματισμό συμπλόκων αθηρωματικών πλακών (195). Άλλες κατηγορίες κυττάρων που βλάπτονται από την έλλειψη του SR-BI είναι τα ερυθροκύτταρα και τα ωοκύτταρα. Πράγματι, τα dKO ποντίκια έχουν άωρα ερυθροκύτταρα (196), ενώ τα θηλυκά είναι στείρα (197). Είναι ενδιαφέρον ότι η φαρμακευτική ουσία προβουκόλη αντιστρέφει τις μορφολογικές ανωμαλίες των ερυθροκυττάρων, αλλά (το πιο σημαντικό) και τις καρδιαγγειακές ιστοπαθολογικές βλάβες των dKO ποντικών, επιμηκύνοντας δραματικά το χρόνο ζωής τους (181). Παράλληλα, βελτιώνει το λιποπρωτεϊνικό «προφίλ» αυτών των ποντικών (181), καθώς ποντίκια με έλλειψη σε SR-BI έχουν διπλάσια ολική χοληστερόλη πλάσματος σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, ενώ η χοληστερόλη αυτή συγκετρώνεται σε μεγάλα, ανομοιογενή λιποπρωτεϊνικά σωμάτια που μοιάζουν με σωμάτια HDL (198). Φαίνεται λοιπόν ότι η δράση του SR-BI μπορεί να συμβάλλει στη διατήρηση της σύστασης της HDL και κατ'επέκταση, στο μεταβολισμό και το φυσιολογικό της ρόλο, ο οποίος περιλαμβάνει την παροχή χοληστερόλης σε στεροειδογόνους ιστούς, όπως τα επινεφρίδια (199-204) και οι ωοθήκες και τελικά την έκκρισή της στη χολή (198). Εκτενέστερος λόγος για το ρόλο του SR-BI στα διάφορα οργανικά συστήματα γίνεται στη «Συζήτηση». Πάντως στον άνθρωπο δεν έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στον SR-BI και επομένως ο φυσιολογικός του ρόλος παραμένει άγνωστος.

Β. Υλικά και Μέθοδοι

Α. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι ακόλουθες πειραματικές μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν με βάση τα πρωτόκολλα των Sambrook et al., 1989, με μικρές τροποποιήσεις. Όλα τα περιοριστικά ένζυμα και τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια dNTPs προέρχονται από την εταιρεία New England Biolabs και οι χημικές ουσίες από τη SIGMA ALDRICH.

1. Υδρόλυση DNA με Περιοριστικά Ένζυμα

Προκειμένου να κλωνοποιηθεί τμήμα DNA σε πλασμιδιακό φορέα είναι απαραίτητη η ενζυματική διάσπασή του με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που δημιουργούν άκρα συμβατά με αυτά που έχουν επιλεγεί για το φορέα. Μετά την επιλογή των κατάλληλων ενζύμων, πραγματοποιείται η αντίδραση της ενζυματικής διάσπασης με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο παρατηρείται η μεγαλύτερη ενζυμική δράση και στη θερμοκρασία που υποδεικνύει η κατασκευάστρια εταιρεία. Είναι σημαντικό ο όγκος του ενζύμου να μην ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη στην οποία αυτό διατηρείται, μειώνει σημαντικά την ενεργότητα του σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

2. Έκλουση Γραμμικών Μορίων DNA από Πήκτωμα Αγαρόζης

Μετά την ηλεκτροφόρηση των υδρολυμένων μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώνονται τμήματα της πηκτής αγαρόζης που περιέχουν τις ζώνες που πρόκειται να κλωνοποιηθούν. Η έκλουση γίνεται με κατάλληλο εμπορικό πακέτο έτοιμων αντιδραστηρίων της εταιρείας Qiagen (QIAEX II Agarose Gel Extraction, # 20021) με το οποίο επιτυγχάνεται δέσμευση των γραμμικών μορίων του DNA σε σφαιρίδια σιλικόνης ή γυαλιού σε υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικού άλατος και σχετικά χαμηλό

pH (pH 5-6). Συγκεκριμένα τα κομμάτια της αγαρόζης που περιέχουν τα γραμμικά μόρια του DNA θερμαίνονται μέσα σε διάλυμα , το οποίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικού άλατος και διασπά τους υδρογονοδεσμούς των σακχάρων στο πολυμερές της αγαρόζης, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το DNA και να δεσμεύεται από τα σφαιρίδια που έχουν προστεθεί στο μίγμα. Τα σφαιρίδια με τα δεσμευμένα μόρια DNA πλένονται με διάλυμα , το οποίο περιέχει αιθανόλη και με αυτό τον τρόπο απομακρύνονται τα άλατα. Τελικά το DNA εκλούεται με νερό ή διάλυμα το οποίο έχει χαμηλή συγκέντρωση άλατος και σχετικά υψηλό pH (pH 7-8), όπως διάλυμα 10mM Tris, pH 8.0.

3. Κλωνοποίηση DNA σε Πλασμιδιακό Φορέα

Για να πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα, γίνεται αντίδραση διασύνδεσης (ligation) σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες ή στους 16°C για 12-16 ώρες, προσθέτοντας τα εξής :

- 50-80ng φορέα
- Ποσότητα ενθέματος που καθορίζεται από την αναλογία μορίων του φορέα με το ένθεμα, λαμβάνοντας υπόψιν ότι για προεξέχοντα άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 3 : 1, ενώ για λεία άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 5-10 :1
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10x :0.5 M Tris, pH 7.4, 0.1M $MgCl_2$, 0.1M DTT, 10mM σπερμιδίνη, 10mM ATP, 1mg/ml BSA)
- 0.75μl BSA (Bovine Serum Albumin; 10mg/ml)
- 0.75μl dATPs (20mM)
- 1μl T4 DNA λιγάση (3-5 units)
- H_2O μέχρι τελικού όγκου 15μl

Στην περίπτωση που τα άκρα ενθέματος και φορέα δεν είναι συμπληρωματικά η αντίδραση σύνδεσης δεν είναι δύνατη και γι' αυτό προηγείται αντίδραση συμπλήρωσης των 5΄-προεξεχόντων άκρων με τη χρήση του μεγάλου ενζυμικού κλάσματος Klenow της

πολυμεράσης Ι του DNA της *E.coli*. Το ένζυμο αυτό είναι ικανό να «γεμίζει» παρουσία δεοξυ-ριβονουκλεοτιδίων τα 5΄προεξέχοντα άκρα που δημιουργούν οι πέψεις περιοριστικών ενδονουκλεασών. Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά με :

- 1 μg DNA
- ρυθμιστικό διάλυμα (1mM Tris – HCl pH 7.5, 0.5mM $MgCl_2$, 0.75M DTT)
- 33μM δεοξυ-ριβονουκλεοτίδια (dNTPs 10mM)
- 1 μονάδα (unit) ενζύμου (5 unit/μl)
- dH_2O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 25μl

Τελικά η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 1μl 0.5 M EDTA pH 8.0.

4. Παρασκευή Δεκτικών για Μετασχηματισμό Βακτηριακών Κυττάρων *E. coli* DH5a

Δεκτικά για μετασχηματισμό χαρακτηρίζονται τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε η κυτταρική τους μεμβράνη να γίνει περισσότερο διαπερατή στο πλασμιδιακό DNA. Στην παρούσα εργασία για το μετασχηματισμό βακτηριακών στελεχών ακολουθήθηκε η χημική μέθοδος. Για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Επωάζουμε, 12-16 ώρες, καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων (DH5a ή BL21 DE3) σε 100ml Luria Bertani medium (LB), αναδευόμενη έντονα στους 37^0C. Σε φλάσκα 1-2 λίτρων προστίθενται 50ml LB το οποίο μολύνεται με 200μl από την παραπάνω καλλιέργεια. Τα κύτταρα επωάζονται υπό ανάδευση στους 37^0 C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 560nm να γίνει 0.450. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στους 4^0 C για 5 λεπτά, στις 2500 rpm. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 20ml διάλυματος TFBI (100mM $RbCl_2$, 50mM $MnCl_2$, 30mM CH_3COOK, 10 mM $CaCl_2$, 87% γλυκερόλη, ρύθμιση του pH στο 5.8 με αραιό CH_3COOK). Τα κύτταρα επωάζονται για 20 λεπτά στον πάγο. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται ξανά στους 4^0 C για 5 λεπτά, στις 2500 rpm. Τα

βακτήρια επαναιωρούνται σε 3ml διάλυματος TFBII (0.2% MOPS, 10mM $RbCl_2$, 80mM $CaCl_2$, 87% γλυκερόλη, και του οποίου το pH έχει ρυθμιστεί σε 7.0 με 1M διάλυμα NaOH) και επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο. Το βακτηριακό αιώρημα μοιράζεται σε κλάσματα των 200μl και διατηρείται στον πάγο. Τελικά αποθηκεύονται στους -80^0 C.

Η ποιότητα των δεκτικών κυττάρων θεωρείται καλή όταν η απόδοσή τους είναι μεγαλύτερη από την ανάπτυξη 10^6 μετασχηματισμένων αποικιών / 1μg πλασμιδιακού DNA.

5. Μετασχηματισμός Βακτηριακών Κυττάρων *E.coli* με Θερμικό Σοκ

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης διασύνδεσης πραγματοποιείται μετασχηματισμός, με ένα μέρος των προϊόντων της αντίδρασης, δεκτικών κυττάρων *E.coli* . Συγκεκριμένα ακολουθείται η εξής διαδικασία :

- Τα δεκτικά κύτταρα διατηρούνται για μικρό χρονικό διάστημα στον πάγο για να ξεπαγώσουν από τους -80^0 C όπου φυλάσσονται.
- Προστίθεται το ανασυνδυασμένο DNA στα κύτταρα (τα 7.5μl από τα 15μl του συνολικού όγκου).
- Τα κύτταρα αφήνονται για 30 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42-43^0 C για 90 δευτερόλεπτα.
- Προστίθενται 800μl θρεπτικού μέσου LB και ακολουθεί επώαση για 50 λεπτά στους 37^0 C.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 3000 rpm.
- Απομακρύνεται το περισσότερο υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε ~100μl LB.
- τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλίο που περιέχει LB και το κατάλληλο μέσο επιλογής (αντιβιοτικό) ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε.
- Τα κύτταρα επωάζονται στους 37^0 C για 16-20 ώρες.

6. Μικρής Κλίμακας Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με τη Μέθοδο της Αλκαλικής Λύσης Κυττάρων

Από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες απομονώνεται μικρή ποσότητα DNA για να ελεγχθεί αν είναι επιτυχημένη η κλωνοποίηση του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

Πραγματοποιούνται καλλιέργειες σε 3ml LB με το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο και ακολουθεί ολονύκτια επώασή τους στους 37^0C. Μεταφέρονται 1.5ml από τις καλλιέργειες σε σωλήνες Eppendorf και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στη μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναιωρούνται τα κύτταρα σε 100μl διαλύματος Ι (βλέπε πίνακα) και τοποθετούνται για 5 λεπτά στον πάγο. Προστίθενται 200μl διαλύματος ΙΙ (βλέπε πίνακα), ακολουθεί προσεκτική ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο. Προστίθενται 150μl διαλύματος ΙΙΙ (βλέπε πίνακα), ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.

	Συστατικά διαλυμάτων	
Διάλυμα Ι	25mM Tris-HCl, pH 8.0	10mM EDTA
Διάλυμα ΙΙ	0.2M NaOH	1% SDS
Διάλυμα ΙΙΙ	3.0M CH_3COOK, pH 5.2	

Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 20 λεπτά στους 4^oC στις 13,000 στροφές ανα λεπτό. Μεταφέρουμε 800 μλ από το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και το ξαναφυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες, ώστε να επιτύχουμε μεγαλύτερη καθαρότητα του DNA. Σε 700 μλ από το υπερκείμενο προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), τα ανακατεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 13,000 στροφές ανά λεπτό. Η διαδικασία αυτή

επαναλαμβάνεται μια φορά. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με ίσο όγκο ισοπροπανόλης και επώαση στους -80°C για 5-10 λεπτά. Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13,000 στροφές ανά λεπτό. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα του DNA με 70% αιθανόλη. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στους 4°C στις 13,000 στροφές ανά λεπτό, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα. Τελικά επαναδιαλύουμε το DNA σε H_2O ή T.E. (10mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA).

Για να ελέγξουμε αν στον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήσαμε έχει κλωνοποιηθεί το επιθυμητό ένθεμα υδρολύουμε το ανασυνδυασμένο DNA με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και μελετάμε το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

7. Μεγάλης Κλίμακας Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με τη Χρήση Στήλης Qiagen

Κάθε φορά που ήταν απαραίτητη η απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA από βακτηριακή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε στήλη Qiagen (tip 100, «Αρ. Κατ.» 12145 ή tip 500 , «Αρ. Κατ.» 12165), με την οποία επιτυγχάνεται πολύ μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με αυτήν της αλκαλικής λύσης και μεγαλύτερη καθαρότητα απομονούμενου DNA.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

Ετοιμάζουμε καλλιέργεια 50-100 ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό και την επωάζουμε ολονύκτια στους 37^{0} C με έντονη ανάδευση. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 10 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 5000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 10ml διαλύματος P1. Προσθέτουμε 10ml διαλύματος P2, ανακατεύουμε ήπια και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 10ml διαλύματος P3, ανακατεύουμε ήπια και επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά

	Συστατικά διαλυμάτων		
P1(20ml)	25mM Tris-HCl, pH 8.0	10mM EDTA	100μg/ml RNase A
P2(50ml)	0.2M NaOH	1% SDS	-
P3(50ml)	3.0M CH_3COOK, pH 5.2	-	-

Το προκύπτον μίγμα διηθείται με τη χρήση υαλοβάμβακα, όπου συγκρατούνται τα στερεά κυτταρικά υπολείμματα. Το διήθημα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στους 4^0C, στις 10.000 rpm. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα και ξαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες για 10 λεπτά. Διατηρούμε το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρησης στον πάγο και ταυτόχρονα προετοιμάζουμε τη στήλη Qiagen προσθέτοντας 4ml διαλύματος QBT, το οποίο απομακρύνεται από την στήλη με τη βαρύτητα. Προσθέτουμε στη στήλη το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης και το αφήνουμε να τη διατρέξει με τη βαρύτητα, ενώ το πλασμιδιακό DNA συγκρατείται στη στήλη. Πλένουμε τη στήλη δύο φορές με 10ml διαλύματος QC. Εκλούουμε το DNA προσθέτοντας στη στήλη 5ml διαλύματος QF.

	Συστατικά διαλυμάτων			
QBT(100ml)	750mM NaCl	50mM MOPS, pH 7.0	15% αιθανόλη	0.15% Triton X -100
QC(100ml)	1.0M NaCl	50mM MOPS, pH 7.0	15% αιθανόλη	_
QF(100ml)	1.25M NaCl	50mM TrisHCl,pH 8.0	15% αιθανόλη	_

Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη ισοπροπανόλης όγκου ίσου με 70% του όγκου του διαλύματος QF και φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4^0C, στις 10.000 rpm. Προσεκτικά αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε το ίζημα με 70% παγωμένη αιθανόλη. Φυγοκεντρούμε ξανά για 10 λεπτά, στους 4^0C, στις 10.000 rpm, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα. Επαναδιαλύουμε το ίζημα DNA σε 100-200 μl H_2O ή T.E.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο τερματισμού αλύσων κατά Sanger (Sanger chain termination method) από το MIT CCR Biopolymers Laboratory.

Β. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Προσδιορισμός της Συγκέντρωσης Πρωτεϊνικού Δείγματος με τη Μέθοδο Lowry

Μεταφέρονται 100 μl πρωτεϊνικού δείγματος και 0, 10, 15, 20 και 25 μg αλβουμίνης βόειου ορρού (BSA, Bovine Serum Albumin) σε δοκιμαστικούς σωλήνες και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 200 μl με ddH_2O. Προστίθενται 1ml διαλύματος Lowry D (25ml Lowry A (2% Na_2CO_3 σε 0.1 N NaOH), 0.25 ml Lowry B (2% NaK Tartrate) και 0.25 ml Lowry C (1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) σε κάθε δείγμα. Τα διαλύματα αναμιγνύονται και επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 100μl διαλύματος Lowry E [αντιδραστήριο Folin (1,2-σουλφονική ναφθοκινόνη) και απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1) υπό ανάδευση. Τα διαλύματα επωάζονται για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η απορρόφηση κάθε δείγματος σε φασματοφωτόμετρο στα 670 nm.

2. Ηλεκτροφορητική Ανάλυση Πρωτεϊνών σε Αποδιατακτικό Πήκτωμα SDS/ Πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE)

Τα κύτταρα λύονται με διάλυμα λύσης Α [1.5% (βάρος/όγκος) octyl glucoside και αναστολείς πρωτεασών (απροτινίνη, leupeptin και Pefabloc SC) Complete® (Roche) σε φυσιολογικό διάλυμα NaCl σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS)]. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 15,000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα. Μέρος του δείγματος (10μg ολικής πρωτεΐνης) φορτώνεται στο πήκτωμα που έχει προετοιμαστεί και του οποίου η περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν (για τον mSR-BI-t1 χρησιμοποιείται πήκτωμα 8% σε ακρυλαμίδη). Η προετοιμασία των δύο τμημάτων του πηκτώματος (πηκτή διαχωρισμού/πηκτή επιστίβαξης) γίνεται με βάση τον παρακάτω πίνακα:

	Πηκτή Διαχωρισμού			Πηκτή Επιστίβαξης
Επιθυμητή Συγκέντρωση Ακρυλαμίδης	8%	12.5%	15%	5%
1.5M Tris pH 8.0	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	0.38ml
30% acryl/0.8% bis acrylamide	2.7 ml	4 ml	5 ml	0.67ml
SDS 20%	0.05ml	0.05ml	0.05ml	0.015 ml
H_2O	4.6 ml	3.3 ml	2.3 ml	2.7 ml
APS 10% (AmmoniumPersulfate, υπερσουλφουρικό αμμώνιο)	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.03ml
TEMED (Tetramethylethylenediamine, τετραμεθυλεθυλενδιαμίνη)	0.005ml	0.005ml	0.005ml	0.003ml

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 35 – 45 mA για 1 ώρα περίπου σε συσκευή BIO-RAD (Mini-PROTEAN3, # 165-3302, 1.5 mm Casting Module, # 165-3340 , 15-well Combs, # 165-3366). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, προκειμένου να εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες, το πήκτωμα βάφεται με χρώση Coomasie Brilliant Blue [1lt: 0.25 gr Coomasie Brilliant blue R250, 100ml acetic acid, 900ml H_2O/μεθανόλης 1:1], ενώ η απομάκρυνση της χρωστικής πραγματοποιείται με ολονύκτια ανάδευση σε διάλυμα 30% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος.

Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χρωστική Bio-Safe Coomassie Stain (BIO-RAD LABORATORIES, # 161-0786). Για τη χρώση αυτή, κάθε πήκτωμα ακρυλαμίδης μικρού μεγέθους (mini-gel) πλένεται τρεις φορές με 200ml ddH_2O , επί 5 λεπτά. Από το δοχείο όπου θα γίνει η χρώση αφαιρείται πλήρως το ddH2O και προστίθενται 50 ml Bio-Safe Commassie Stain. Το δοχείο αναδεύεται ελαφρά για 1 ώρα. Οι πρωτεϊνικές ζώνες είναι εμφανείς μέσα σε 20 λεπτά και φτάνουν τη μέγιστη έντασή τους σε 1 ώρα. Αν το πήκτωμα επωαστεί για περισσότερη ώρα, δεν αυξάνεται η χρώση υποβάθρου. Το πήκτωμα στη συνέχεια πλένεται σε 200ml διπλά απεσταγμένου νερού (ddH_2O) για 30 λεπτά τουλάχιστον ώστε να αφαιρεθεί η περίσσεια της χρωστικής και μπορεί στη συνέχεια να αποθηκευτεί σε νερό ή να αφυδατωθεί σε ειδικό αποξηραντή πηκτωμάτων (gel dryer).

3. Χρώση Αργύρου

Προκειμένου να γίνουν ορατές στο πήκτωμα πολύ μικρές ποσότητες πρωτεΐνης (της τάξης των νανογραμμαρίων), χρησιμοποιείται η χρώση αργύρου. Για τη χρώση αυτή χρησιμοποιήθηκε το kit Silver stain plus (BIO-RAD, # 161-0449). Για τη χρώση 2 mini-gels ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα πηκτώματα τοποθετούνται στο Fixative Enhancer Solution, το οποίο αποτελείται από:

Μεθανόλη	200ml	50% (όγκος/όγκος)
Οξικό οξύ	40ml	10% (όγκος/όγκος)
Fixative Enhancer Concentate	40ml	10% (όγκος/όγκος)
(BIO-RAD, Αριθ. Κατ. 161-0461, διάλυμα γλυκερόλης σε νερό)		
Απιονισμένο Απεσταγμένο Νερό	120ml	30% (όγκος/όγκος)

Ακολουθεί ανάδευση για 20 λεπτά. Απορρίπτεται το fixative enhancer solution και ανικαθίσταται από 400ml απιονισμένο απεσταγμένο νερό με το οποίο πλένονται τα πηκτώματα για 10 λεπτά με ήπια ανάδευση. Επαναλαμβάνεται το βήμα της πλύσης μία φορά. Ακολουθεί η χρώση των πηκτωμάτων. Το διάλυμα χρώσης παρασκευάζεται 5 λεπτά πριν τη χρήση του, ως εξής:

Προστίθενται 35ml απιονισμένου νερού σε γυάλινη φυάλη και αναδεύονται με μαγνητική ράβδο. Στη συνέχεια προστίθενται τα παρακάτω στη φυάλη με την εξής σειρά:

5.0 ml Silver Complex Solution (BIO-RAD, Αριθ. Κατ. 161-0462, έχει ως βάση νιτρικό αμμώνιο και νιτρικό άργυρο)
5.0 ml Reduction Moderator Solution (BIO-RAD, Αριθ. Κατ. 161-0463, έχει ως βάση το tungstosilicic acid)
5.0 ml Image Development Reagent (BIO-RAD, Αριθ. Κατ. 161-0464, έχει ως βάση τη φορμαλδεΰδη)

Αμέσως πριν από τη χρήση προστίθενται στη φλάσκα 50ml Development Accelerator Solution*, το οποίο φέρεται προηγουμένως σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ανάδευση και το περιεχόμενο της φλάσκας προστίθεται στο δοχείο χρώσης. Ακολουθεί η χρώση των πηκτωμάτων με ήπια ανάδευση. Αυτή διαρκεί περίπου 20 λεπτά ή μέχρι να επιτευχθεί το επίπεδο χρώσης που επιθυμούμε. Πάντως, ο χρόνος που απαιτείται για τη χρώση εξαρτάται από το δείγμα και την ποσότητα της πρωτεΐνης που έχει φορτωθεί στο πήκτωμα. Όταν επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο χρώσης, τα πηκτώματα τοποθετούνται σε 5% οξικό οξύ για 15 λεπτά, προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, το πήκτωμα πλένεται για 5 λεπτά σε απιονισμένο νερό και στη συνέχεια μπορεί να φωτογραφηθεί.

*Το Development Accelerator Solution προετοιμάζεται εκ των προτέρων ως εξής:

Προστίθενται 950ml απιονισμένου απεσταγμένου νερού σε κύλινδρο του 1 λίτρου που περιέχει μαγνητική ράβδο ανάδευσης. Στη συνέχεια προστίθεται στον κύλινδρο υπό ανάδευση ολόκληρο το περιεχόμενο του δοχείου Development Accelerator Reagent (BIORAD, Αριθ. Κατ. 161-0448, έχει ως βάση το ανθρακικό νάτριο) μέχρι διάλυσης. Προστίθεται επιπλέον νερό μέχρι το 1 λίτρο και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C (αλλά χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου).

4. Ανάλυση Western

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρονται σε μεμβράνη Immun-Blot PVDF (BIO-RAD LABORATORIES, #162-0174) με τη μέθοδο της υγρής ηλεκτρομεταφοράς, σε συσκευή BIO-RAD (Mini Trans-Blot Cell, # 170-3930, Fiber Pads, # 170-3933) και με ένταση 400 mA για 2 ώρες στους 4^{0}C. Το διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς που χρησιμοποιείται αποτελείται από 0.25M Tris pH 8.3, 192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη. Μετά την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη ξηραίνεται στον αέρα. Στη συνέχεια, εμβαπτίζεται στιγμιαία σε 100% μεθανόλη. προκειμένου να ενεργοποιηθεί και μεταφέρεται σε δοχείο

με διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών πρωτεϊνών (blocking) [5% (βάρος/όγκος) άπαχο γάλα σε σκόνη σε 1X PBS] το οποίο δεσμεύει τις μη-ειδικές θέσεις δέσμευσης του αντισώματος. Εκεί επωάζεται με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα σε διάλυμα blocking και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα KKB1, το οποίο αναγνωρίζει το καρβοξυ-τελικό άκρο του SR-BI, χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1:8000. Η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος απομακρύνεται με τρεις πλύσεις της μεμβράνης, διάρκειας 15 λεπτών η κάθε μία, με διάλυμα πλύσης 0.5% NP-40 σε PBS. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα GaR – HRP (Goat anti Rabbit Horse Radish Peroxidase, Amersham Biosciences), το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα blocking σε τελική συγκέντρωση 1:5000, επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος απομακρύνεται με τρεις πλύσεις 15 λεπτών της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης και ακολουθεί εμφάνιση με χρήση του συστήματος αυξημένης χημειοφωταύγειας ECL Plus Western Blotting System της εταιρείας Amersham Biosciences (#RPN2132) και με χρήση φωτοευαίσθητου φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, # RPN1674K).

5. Πέψη Πρωτεϊνών με Ενδογλυκοζιδάση Η (EndoH) και Ν-Γλυκανάση (PNGaseF)

α. Πέψη με PNGaseF

Η Ν-γλυκοζιδάση F (PNGase F, New England Biolabs, Αριθ. Κατ. P0704S) είναι μια αμιδάση η οποία προέρχεται από το μικροοργανισμό *Flavobacterium meningosepticum* και πέπτει ανάμεσα στις πιο εσωτερικές ομάδες GlcNAc που συνδέονται στα υπολείματα ασπαραγίνης των υψηλής μανόζης, υβριδικών και συμπλόκων Ν-ολιγοσακχαριτών. Για την πέψη αυτή, 20 μgs ολικής πρωτεΐνης σε κυτταρικό εκχύλισμα αποδιατάσσονται με 1X διάλυμα αποδιάταξης γλυκοπρωτεϊνών (Glycoprotein Denaturing Buffer) [5% SDS, 0.4M DTT] στους 100°C για 10min. Προστίθενται 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης 10X G7 Buffer [50 mM sodium phosphate], 10% NP-40 και 2.5μl PNGaseF (500,000 μονάδες/ml, όπου μονάδα είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την αφαίρεση > 95% των υδατανθράκων από 10 μg αποδιατεταγμένης RNase B σε 1 ώρα

στους 37°C σε αντίδραση συνολικού όγκου 10 μl) και η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 6 ώρες.

β. Πέψη με EndoH

Η ενδογλυκοζιδάση Η (EndoH, New England Biolabs, Αριθ. Κατ. P0702S) είναι μια ανασυνδυασμένη γλυκοζιδάση η οποία προέρχεται από το μικροοργανισμό *Streptomyces plicatus* και πέπτει τον πυρήνα χιτοβιόζης των υψηλής μανόζης και υβριδικών N-ολιγοσακχαριτών. Για την πέψη αυτή, 20 μgs ολικής πρωτεΐνης σε κυτταρικό εκχύλισμα αποδιατάσσονται με 1X Glycoprotein Denaturing Buffer [5% SDS, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη] στους 100°C για 10'. Προστίθενται 1/10 του όγκου της αντίδρασης 10X G5 Buffer [0.5 M κιτρικό νάτριο, pH 5.5 στους 25°C] και 2.5μl EndoH (500,000 μονάδες/ml, όπου μονάδα είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την αφαίρεση > 95% των υδατανθράκων από 10 μg αποδιατεταγμένης RNase B σε 1 ώρα στους 37°C σε αντίδραση συνολικού όγκου 10 μl) και η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 6 ώρες.

Γ. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Καλλιέργεια Κυτταρικών Σειρών HEK293S σε Τρυβλία

Χρειάζεται μεγάλη προσοχή όταν δουλεύει κανείς με κυτταρικές σειρές, διότι κυτταρική βλάβη προκαλούμενη σε αρχικό στάδιο μπορεί να επηρεάσει την επακόλουθη ποιότητα και απόδοση των κυτταρικών σειρών. Τα κύτταρα δεν πρέπει ποτέ να αφήνονται να μεγαλώσουν υπεβολικά και ποτέ δεν πρέπει να διαιρούνται σε αναλογία μεγαλύτερη από 1:20. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται υπό άσηπτες συνθήκες σε απαγωγό τύπου Sterilgard (εκτός όπου αναφέρεται συγκεκριμένα το αντίθετο). Όλα τα αντικείμενα που μεταφέρονται στην απαγωγό αποστειρώνονται επιφανειακά με 70% αιθανόλη. Όλα τα γυάλινα δοχεία, εργαλεία κλπ. αποστειρώνονται σε κάμινο αποστείρωσης, ενώ προμηθευόμαστε τα πλαστικά αντικείμενα/εργαλεία ήδη αποστειρωμένα. Όλα τα διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω ηθμού πόρων διαμέτρου 0.22 μm. Όπου

είναι απαραίτητο, τα διαλύματα που χρησιμοποιούμε (θρεπτικά μέσα κλπ.) προθερμαίνονται στους 37^0C πριν έλθουν σε επαφή με τα κύτταρα. Οι κυτταρικές σειρές HEK (Human Embryonic Kidney), ευγενική δωρεά από τον δρα P.J. Reeves και το εργαστήριο του καθηγητή H.B. Khorana (M.I.T.), διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο A (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (CELLGRO, #10-013-CV) /Ham's F-12 medium (CELLGRO, #10-080-CV) (1:1), 50 units/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, 2 mM glutamine (Invitrogen) και 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Βόειος Εμβρυϊκός Ορός, JRH Biosciences) σε θάλαμο επώασης 37°C με αναλογία αερίων 95% αέρας / 5% CO_2. Ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι 24-48 ώρες όταν η αρχική αραίωση των κυττάρων ήταν 1:5.

Για μεταφορά των κυττάρων σε νέες καλλιέργειες (plating) σε τρυβλία διαμέτρου 15cm, οι αρχικές καλλιέργειες πλένονται μια φορά με 10ml, 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) και ακολουθεί προσθήκη 2ml τρυψίνης. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θερμαινόμενη επιφάνεια 37°C για ~1min και στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλώνται ταχέως με επανειλημένη επίκρουση του τρυβλίου. Προστίθενται αμέσως 8ml θρεπτικού μέσου Α προκειμένου να τερματιστεί η περαιτέρω δράση της τρυψίνης (η παρουσία ορού είναι απαραίτητη για το σκοπό αυτό). Τα κύτταρα αναρροφώνται περίπου 10 φορές με πιπέτα 10 ml προκειμένου να διασπαστούν τελείως τα κυτταρικά συσσωματώματα και ακολουθεί η μεταφορά 2 ml των κυττάρων σε νέο τρυβλίο όπου έχουμε προσθέσει ήδη 20 ml θρεπτικού μέσου (αραίωση 1/10). Τα κύτταρα αναδεύονται ήπια στα τρυβλία, τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης 37°C.

Για μακράς διάρκειας διατήρηση των κυτταρικών σειρών, κύτταρα από ένα τρυβλίο 10 cm που καλύπτουν περίπου 90% της επιφάνειας αυτού (90% confluency) (περίπου 10^7 κύτταρα) αποκολλώνται με τρυψίνη όπως περιγράφεται πιο πάνω, προστίθενται 10ml θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στη ρύθμιση 4 κλινικής φυγοκέντρου IEC. Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 4 ml προθερμασμένου θρεπτικού μέσου κατάψυξης (90% FBS, 10% DMSO) και τα κύτταρα επαναιωρούνται ήπια με πιπέτα 5 ml. Μεταφέρονται κλάσματα 1 ml σε θερμοάντοχα φιαλίδια τύπου Corning, τα οποία τοποθετούνται σε

κουτιά από αφρολέξ. Τα κουτιά μεταφέρονται σε καταψύκτη -80°C και αφήνονται εκεί ολονυκτίως (υπό αυτές τις συνθήκες, ο ρυθμός ψύξης των κυττάρων θα είναι περίπου 1°C/ λεπτό) και την επόμενη μέρα μεταφέρονται σε υπερκαταψύκτη -150°C υγρού αζώτου. Στην κατάσταση αυτή, οι κυτταρικές σειρές θα πρέπει να είναι σταθερές για χρόνια.

Προκειμένου να αποψυχθούν τα κύτταρα από τους -150°C, το οποίο πρέπει να γίνει ταχέως, τα φιαλίδια μεταφέρονται σε λουτρό ύδατος 37°C με χρήση ειδικών γυαλιών ασφαλείας, για τον περιορισμό κινδύνου έκρηξης και αναδεύονται ήπια έως ότου τα κύτταρα αποψυχθούν. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια πλένονται εξωτερικά με 70% αιθανόλη και τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα Falcon 15 ml, όπου προστίθενται αργά (επί 2 λεπτά) και υπό ανάδευση, 10 ml προθερμασμένου θρεπτικού μέσου DMEM/F12. Αυτό γίνεται προκειμένου να διαχυθεί το DMSO από τα κύτταρα. Αν η διαδικασία αυτή πραγματοποιηθεί πολύ γρήγορα, θα οδηγήσει σε οσμωτική βλάβη των κυττάρων και μείωση της βιωσιμότητάς τους. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στη ρύθμιση 4 κλινικής φυγοκέντρου IEC, αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και προστίθενται 10 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου DMEM/F12. Τα κύτταρα επαναιωρούνται και μεταφέρονται σε τρυβλίο 10 cm, όπου επωάζονται στους 37 °C και σε περιβάλλον 5% CO_2. Τα κύτταρα θα πρέπει να αρχίσουν να προσκολλώνται μέσα σε μερικές ώρες, ενώ περισσότερα από το 80% θα πρέπει να προσκολληθούν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα κύτταρα θα πρέπει να είναι έτοιμα για επέκταση εντός 2-3 ημερών.

2. Παροδική Διαμόλυνση Ευκαρυωτικών Κυττάρων HEK293S με τη Μέθοδο Lipofectamine

Το αντιδραστήριο LIPOFECTAMINE (Invitrogen) είναι μια 3:1 (βάρος/βάρος) παρασκευή λιποσωμάτων του πολυκατιονικού λιπιδίου 2,3 dioleyloxyn [2(sperminecarboxamido)ethyl]n, N dimethyl 1 propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) και του ουδέτερου λιπιδίου dioleoyl phosphatidylethanolamine,σε

φιλτραρισμένο νερό. Για την παροδική διαμόλυνση κυττάρων HEK293S ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

α. Σε τρυβλίο 24 πηγαδιών μεταφέρονται ~ 1-3 X 10^5 κύτταρα ανά πηγάδι σε 0.5 ml θρεπτικού μέσου Α. Προκειμένου για κύτταρα HEK293S, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τρυβλία Poly-D-Lysine (BECTON DICKINSON, # 354414), για καλύτερη πρόσδεση των κυττάρων.

β. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα CO_2 μέχρι να φθάσουν να καταλαμβάνουν 50-70% της επιφάνειας των πηγαδιών. Αυτό απαιτεί συνήθως 18-24 ώρες, αλλά ο χρόνος ποικίλει αναλόγως της κυτταρικής σειράς.

γ. Προετοιμάζονται τα ακόλουθα διαλύματα: διάλυμα Α: Για κάθε διαμόλυνση, μεταφέρονται 1-2 μg DNA σε 100μl θρεπτικού μέσου DMEM/F12 που δεν περιέχει ορρό. Το θρεπτικό μέσο OPTI-MEM, (GIBCO BRL, # 3201985) δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Διάλυμα Β: Για κάθε διαμόλυνση, μεταφέρονται 2- 2.5ul του αντιδραστηρίου LIPOFECTAMINE σε 100ul θρεπτικού μέσου που δεν περιέχει ορρό.

δ. Τα δύο διαλύματα συνδυάζονται, αναμιγνύονται ήπια και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15-45 min.

ε. Τα κύτταρα πλένονται μιά φορά με 2ml θρεπτικού μέσου.

ζ. Για κάθε διαμόλυνση, προστίθενται 0.8ml θρεπτικού μέσου σε κάθε σωλήνα που περιέχει τα σύμπλοκα λιπιδίων-DNA. Θρεπτικό μέσο που περιέχει 5% ορό μπορεί να προστεθεί στα σύμπλοκα DNA-λιπιδίων σε αυτό το βήμα. Ακολουθεί ήπια ανάμιξη του μίγματος και προσθήκη του στα πλυμένα κύτταρα.

η. Τα κύτταρα επωάζονται για 2- 24h σε 37 ^{o}C σε ατμόσφαιρα CO_2.

θ. Προστίθεται 1ml θρεπτικού μέσου που περιέχει δύο φορές την κανονική συγκέντρωση ορού χωρίς αφαίρεση του μίγματος διαμόλυνσης.

ι. Το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται 18-24h μετά από την έναρξη της διαμόλυνσης.

κ. Η έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης μπορεί να ελεγχθεί με την κατάλληλη δοκιμασία (π.χ. με δοκιμασία πρόσληψης DiI-HDL, βλέπε πιο κάτω) 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

3. Δοκιμασία Πρόσληψης DiI-HDL από Κύτταρα που Εκφράζουν SR-BI

Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση του SR-BI σε σταθερές κυτταρικές σειρές ή κυτταρικές σειρές παροδικά διαμολυσμένες με πλασμίδιο έκφρασης για τον SR-BI, πραγματοποιείται η δοκιμασία πρόσληψης DiI-HDL. Η DiI-HDL αποτελείται από HDL που φέρει τη φθορίζουσα ένωση DiI (DiI : 1,1',di-octadecyl-3,3,3'3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), μια καρβοκυανίνη προσδεδεμένη στο φωσφολιπιδικό «κέλυφος» της HDL. Η ένωση αυτή προσλαμβάνεται από κύτταρα που εκφράζουν SR-BI.

Για τη δοκιμασία αυτή, σε θρεπτικό μέσο Α προστίθενται 0.5% (βάρος/όγκος) BSA και 10μg/ml DiI-HDL. Το μέσον αυτό διηθείται με φίλτρο 0.22μm και προστίθεται στα κύτταρα (8-10 mls ανά τρυβλίο 10 cm ή 0.5 ml ανά πηγάδι σε τρυβλίο 24 θέσεων). Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37°C και παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Ο φθορισμός των κυττάρων αντιστοιχεί στην προσειλημένη DiI-HDL και επομένως στο επίπεδο έκφρασης του SR-BI. Προκειμένου για σταθερές κυτταρικές σειρές HEK293, πραγματοποιούνται τα βήματα α και β της προηγούμενης παραγράφου και ακολουθεί η δοκιμασία πρόσληψης της DiI-HDL.

4. Κατασκευή Σταθερής Κυτταρικής Σειράς HEK293S για την Επαγώμενη Έκφραση του mSR-BI-t1 με τη Μέθοδο Λιποφεκταμίνης (Lipofectamine)

Η ίδια διαδικασία με αυτήν που περιγράφεται στη μέθοδο παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιείται για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών, με τη διαφορά ότι αντί για έλεγχο της έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης, γίνεται προσθήκη στο θρεπτικό μέσον, κατάλληλου αντιβιοτικού [π.χ. GENETICIN, GIBCO BRL (# 11811-031)], που προσδιορίζει την ενσωμάτωση στα κύτταρα του γονιδίου αντίστασης, το οποίο περιέχει το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση (σημειωτέον, κατά την προετοιμασία διαλύματος GENETICIN πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν το ότι η ενεργός συγκέντρωσή της είναι συνήθως μικρότερη από την πραγματική συγκέντρωση και αναφέρεται από την κατασκευάστρια εταιρεία). Για την κατασκευή των σταθερών κυτταρικών σειρών HEK293S GnTI^{-} TetR [mSR-BI t1],

χρησιμοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες των κυττάρων αυτών σε δύο τρυβλία 10 cm, κάθε ένα από τα οποία διαμολύνθηκε με 24 μg του πλασμιδίου pACMV tetO [mSR-BI-t1]. Την επόμενη μέρα, κάθε ένα από τα δύο τρυβλία χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή τεσσάρων νέων τρυβλίων 10 cm με $2X10^3$, $2X10^4$, $2X10^5$ ή $2X10^6$ κύτταρα, αντίστοιχα. Αυτό έγινε προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη κυτταρική πυκνότητα που επιτρέπει την αναγνώριση διακριτών κυτταρικών αποικιών μετά την επιλογή με το αντιβιοτικό. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσον Α στο οποίο προσετέθη G418 (0.25 mg/ml κατά την πρώτη εβδομάδα και 0.5 mg/ml κατά τη δεύτερη εβδομάδα) και μεμονωμένες αποικίες εμφανίστηκαν μετά από 2 εβδομάδες.

5. Καλλιέργεια Κυττάρων HEK293S σε Βιοαντιδραστήρα CELLIGEN PLUS

α. Συναρμολόγηση του Βιοαντιδραστήρα

Ο βιοαντιδραστήρας CELLIGEN PLUS αποτελείται από δύο κύρια μέρη: την κύρια μονάδα, που είναι υπεύθυνη για τον ηλεκτρονικό έλεγχο όλων των λειτουργιών του βιοαντιδραστήρα και τη δεξαμενή καλλιέργειας, η οποία έχει χωρητικότητα 14.4L. Η κύρια μονάδα έχει μια οθόνη όπου μπορούμε να επιλέξουμε εναλλακτικά 3 οθόνες ελέγχου: α) την "ΚΥΡΙΑ" (“MASTER”) οθόνη όπου μπορούμε ανά πάσα στιγμή να δούμε την τιμή του pH της καλλιέργειας, το ποσοστό του διαλυμένου O2 (DO) στην καλλιέργεια και τη θερμοκρασία της (T) β) την οθόνη "ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ" (“CALIBRATION”) , των οργάνων μέτρησης του pH και του διαλυμένου οξυγόνου και γ) την οθόνη "4 ΑΕΡΙΩΝ", όπου φαίνεται το ποσοστό των αερίων (αέρας, N_2, O_2 & CO_2) που διοχετεύονται στην καλλιέργεια ανά πάσα στιγμή. Η δεξαμενή καλλιέργειας αποτελείται από την κυρίως, γυάλινη δεξαμενή και το μεταλλικό της σκέπαστρο, το οποίο φέρει το στροφίο με την έλικα ανάδευσης της καλλιέργειας, το μεταλλικό σωλήνα παροχής αερίων, πλαστικούς σωλήνες για την προσθήκη και άντληση θρεπτικού μέσου και κυττάρων και τη λήψη δειγμάτων από την καλλιέργεια και τη θήκη όπου τοποθετείται εξωτερικά το θερμόμετρο για τη μέτρηση και παρακολούθηση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας. Στους πλαστικούς σωλήνες που εξέρχονται από το σκέπαστρο και χρησιμεύουν για λήψη δειγμάτων της καλλιέργειας, προσαρμόζονται

γυάλινοι σωλήνες για καλύτερο έλεγχο ροής. Στο σκέπαστρο προσαρμόζονται επίσης τα όργανα μέτρησης του pH και του διαλυμένου οξυγόνου. Το σκέπαστρο προσαρμόζεται με βίδες πάνω στη γυάλινη δεξαμενή. Η δεξαμενή φέρει περιμετρικά, διπλό τοίχωμα, στο οποίο κυκλοφορεί νερό βρύσης προερχόμενο από ψυκτική συσκευή που είναι συνδεδεμένη με το βιοαντιδραστήρα εξωτερικά. Το κυκλοφορούν αυτό νερό διατηρεί τη θερμοκρασία της καλλιέργειας στην τιμή που επιλέγουμε εμείς (συνήθως 37°C). Επίσης, διατηρεί χαμηλή τη θερμοκρασία της κεντρικής μονάδας (συνήθως 15°C). Είναι πολύ σημαντικό το να μην τεθεί ποτέ σε λειτουργία η κύρια μονάδα χωρίς να έχει προηγουμένως τεθεί σε λειτουργία η συσκευή ψύξης, προκειμένου να προσαρμοστεί η θερμοκρασία του νερού στην τιμή που επιλέγουμε εμείς (συνήθως 15°C, όπως αναφέρθηκε).

Η δεξαμενή 14.4L προσαρμόζεται σε μεταλλική βάση της συσκευής πάνω σε 2 εξοχές. Γεμίζουμε τη δεξαμενή με ~5.5 L PBS (1X) ή απεσταγμένο H_2O και βιδώνουμε το σκέπαστρο (προκειμένου να εξασφαλίσουμε τη στεγανότητα της δεξαμενής, βοηθά να αλείψουμε τις επιφάνειες όπου το δοχείο και το σκέπαστρο έρχονται σε επαφή, με παραφίνη). Σε αυτό το σημείο, ο μετρητής pH (που, μετά από κάθε καλλιέργεια πλένεται και τοποθετείται σε δοχείο με 1X PBS προκειμένου να μη βλαβεί η κεφαλή του) και ο μετρητής διαλυμένου O_2 (που, μετά από κάθε καλλιέργεια, ξεπλένεται με νερό βρύσης, στεγνώνεται και αποθηκεύεται στο αφρολέξ κουτί του), δεν έχουν τοποθετηθεί στο σκέπαστρο ακόμα. Όλοι οι πλαστικοί και γυάλινοι σωλήνες αφήνονται ώς έχουν μετά από κάθε καλλιέργεια (εκτός αν έχει επισυμβεί μόλυνση της καλλιέργειας, οπότε αντικαθίστανται όλες οι σωληνώσεις και τα φίλτρα). Αντιθέτως, τα φίλτρα αφαιρούνται μετά από κάθε καλλιέργεια, επειδή εάν διαβραχούν κατά το πλύσιμο της δεξαμενής είναι πλέον ανενεργά). Έτσι ένα βασικό στοιχείο στη συναρμολόγηση της δεξαμενής είναι η τοποθέτηση των φίλτρων στην άκρη των πλαστικών σωλήνων που βγαίνουν από το σκέπαστρο. Επομένως, όλοι οι πλαστικοί σωλήνες που βγαίνουν από το σκέπαστρο και που δεν είναι συνδεμένοι με γυάλινους σωλήνες, πρέπει να κλείνονται με φίλτρα. Οι γυάλινοι σωλήνες καλύπτονται με αλουμινόχαρτο. Όλοι οι πλαστικοί σωλήνες κλείνονται με μεταλλικούς σφιγκτήρες κοντά στην έξοδό τους από το σκέπαστρο. Οι σφιγκτήρες παραμένουν στη θέση τους καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και

αφαιρούνται μόνο προσωρινά κατά την εισαγωγή κυττάρων ή/και θρεπτικού και τη λήψη δειγμάτων καλλιέργειας. Αυτό γίνεται για αποφυγή πιθανής μόλυνσης της καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης της δεξαμενής, τουλάχιστον ένας σφιγκτήρας πρέπει να αφαιρείται, προκειμένου να αποτραπεί η ανάπτυξη υπερβολικής πίεσης μέσα στη δεξαμενή.

β. Ενεργοποίηση του Βιοαντιδραστήρα

Ο βιοαντιδραστήρας ενεργοποιείται από ένα διακόπτη ON/OFF που υπάρχει στη δεξιά πλευρά της κύριας μονάδας του. Πρίν ανοίξουμε τη μονάδα, ο ψύκτης του νερού πρέπει να έχει φθάσει στην καθορισμένη θερμοκρασία (15°C), όπως προαναφέρθηκε. Πρίν θέσουμε σε λειτουργία τον ψυκτήρα, βεβαιωνόμαστε ότι είναι γεμάτος με νερό και εάν δεν είναι, τον γεμίζουμε με νερό βρύσης (και ΟΧΙ απεσταγμένο νερό). Επίσης, η στάθμη του ύδατος πρέπει να ελέγχεται περιοδικά και κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

γ. Βαθμονόμηση του pH-μέτρου

Το pH-μετρο βαθμονομείται πριν την αποστείρωση της δεξαμενής και στη συνέχεια προσαρμόζεται στο σκέπαστρο και αποστειρώνεται με τη δεξαμενή. Προκειμένου να βαθμονομηθεί, αφαιρείται από το διάλυμα 1Χ PBS όπου φυλάσσεται μετά από κάθε καλλιέργεια και προσαρμόζεται σ'αυτό το καλώδιο του pH-μέτρου που είναι συνδεδεμένο στην κεντρική μονάδα. Ακολούθως, μεταφέρεται διαδοχικά σε δύο ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών τιμών pH (συνήθως 7 και 10) και εισάγονται στην οθόνη της κύριας μονάδας οι δύο τιμές, αφού σταθεροποιηθεί η ένδειξη του pH. Στη συνέχεια, το pH-μετρο εισάγεται στη δεξαμενή μέσω της κατάλληλης υποδοχής του σκεπάστρου και προσαρμόζεται σε αυτό το καπάκι του, σε προετοιμασία για την αποστείρωση. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να ληφθεί κατά το χειρισμό αυτό, ειδικά με το pH-μετρο της δεξαμενής 14.4L, επειδή αυτό μπορεί εύκολα να υποστεί θραύση.

Μερικές φορές, μετά από την αποστείρωση της δεξαμενής και αφού συνδέσουμε το pH-μετρο στην κύρια μονάδα, η ένδειξη του pH μπορεί να είναι πολύ υψηλή ή να μη

μεταβάλλεται. Πολλές φορές, μετά από μερικά λεπτά, η ένδειξη επανέρχεται στις φυσιολογικές τιμές (~7 στην περίπτωση που στη δεξαμενή έχουμε προσθέσει 1X PBS). Επίσης, αμέσως μετά την αποστείρωση, όταν η θερμοκρασία του υγρού στη δεξαμενή είναι ακόμη πολύ υψηλή, η ένδειξη του pH μπορεί να είναι προσωρινά, επίσης πολύ υψηλή. Ενδεχόμενα τέτοια προβλήματα μπορεί να επιλυθούν με προσαρμογή της θέσης του καλωδίου του pH-μέτρου. Αν παρουσιαστεί μόνιμο πρόβλημα σε κάποιο σημείο, ο μετρητής pH θα πρέπει να αντικατασταθεί.

δ. Αποστείρωση της Δεξαμενής 14.4L

Πρίν την αποστείρωση θα πρέπει να βεβαιωνόμαστε ότι α) οι σωλήνες που βγαίνουν από τη δεξαμενή 14.4L (καθώς και από τα δοχεία που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά κυττάρων και θρεπτικού μέσου) είναι κλεισμένα με πλαστικά φίλτρα και β) ότι το pH-μετρο και ο μετρητής διαλυμένου O_2 είναι ενσωματωμένα στο σκέπαστρο και καλύπτονται με τα προστατευτικά καλύμματά τους. Η δεξαμενή 14.4L αποστειρώνεται για τουλάχιστον 1 ωρα στον «υγρό» κύκλο σε κάμινο αποστείρωσης.

ε. Βαθμονόμηση του Μετρητή Διαλυμένου Οξυγόνου (Dissolved Oxygen, DO)

Ο μετρητής διαλυμένου O_2 βαθμονομείται σε δύο βήματα. Το πρώτο βήμα πραγματοποιείται μετά την αποστείρωση της δεξαμενής και συνίσταται στο μηδενισμό της ένδειξης “DO” (Dissolved Oxygen) στην οθόνη της κύριας μονάδας. Ακολουθεί σύνδεση του μετρητή με το κατάλληλο καλώδιο της κύριας μονάδας και άντληση αέρα στη δεξαμενή (που περιέχει σε αυτό το στάδιο 1X PBS ή ddH_2O), ολονυκτίως. Για να γίνει αυτό, συνδέουμε τον πλαστικό σωλήνα που διοχετεύει το μίγμα αερίων στην καλλιέργεια, με την αεραντλία (vacuum pump, GAST, Model DOA-P704-AA), ανοίγουμε την αντλία και θέτουμε την πίεσή της στα 10psi. Έπειτα επιλέγουμε την ένδειξης “MANUAL” στην οθόνη "4 ΑΕΡΙΩΝ" και θέτουμε την ένδειξη "CO_2" στην τιμή "0", στην ίδια οθόνη. Παράλληλα, γίνεται ενεργοποίηση του στροφίου/έλικας ανάδευσης. Αυτή στρέφεται από τον ηλεκτρομαγνήτη που είναι συνδεδεμένος στην κύρια μονάδα. Το πρώτο βήμα στη λειτουργία του στροφίου, είναι η τοποθέτηση του

ηλεκτρομαγνήτη στη βάση του στο κέντρο του σκεπάστρου. Είναι πολύ σημαντικό να βεβαιωθούμε ότι η ρύθμιση "AGITATION" (ανάδευση) είναι στη θέση OFF καθώς γίνεται αυτή η τοποθέτηση, γιατί διαφορετικά ο ηλεκτρομαγνήτης μπορεί να υποστεί βλάβη και να χρειαστεί αντικατάσταση. Επίσης, πρέπει να βεβαιωθούμε ότι ο ηλεκτρομαγνήτης είναι καλά προσαρμοσμένος στη βάση του. Σε αυτό το σημείο, μπορούμε να θέσουμε σε λειτουργία το στροφίο, ρυθμίζοντας την ένδειξη "Agitation" στην οθόνη "Master", στις 15rpm και αμέσως κατόπιν, σε 30rpm ή υψηλότερες στροφές (η ταχύτητα του στροφίου πρέπει να αυξάνεται βαθμιαία). Το δεύτερο βήμα στη βαθμονόμηση γίνεται την επόμενη ημέρα, μετά την πόλωση του μετρητή διαλυμένου O_2 από τον αντληθέντα αέρα και συνίσταται στην εισαγωγή της τιμής 100 στην επιλογή DO (Dissolved Oxygen). Κατά τη διάρκεια της βαθμονόμησης, μετά από πολλούς κύκλους λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα, ο μετρητής διαλυμένου O_2 μπορεί να παρουσιάσει προβλήματα. Αν τα προβλήματα αυτά δεν λυθούν με αντικατάσταση του ηλεκτρολύτη στην άκρη του μετρητή, θα χρειαστεί αντικατάστασή του.

ζ. Δοκιμή του Βιοαντιδραστήρα για Μόλυνση

Όταν τα κύτταρα με τα οποία θα αρχίσει η καλλιέργεια είναι στο στάδιο των 10 τρυβλίων διαμέτρου 15 εκατ. (ή ακόμα και πιό νωρίς), μπορεί να γίνει μια "δοκιμαστική λειτουργία" του βιοαντιδραστήρα, προκειμένου να αποκλειστεί η ανάπτυξη μικροβίων στη δεξαμενή εξαιτίας ανεπαρκούς καθαρισμού, αποστείρωσης κ.λ.π. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιείται ακυτταρική «καλλιέργεια» με ~2L θρεπτικού μέσου που αποτελούνται από 15gr Primatone RL-UF [Quest International (Hoffman Estates, IL)] και ~5gr σκόνη DMEM [Atlanta Biologicals (Norcross, GA)] διαλυμένα σε 2L ddH_2O, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στην Ημέρα 4 (βλέπε πιο κάτω). Όλα τα θρεπτικά μέσα που εισάγωνται στη δεξαμενή πρέπει να είναι αποστειρωμένα με διήθηση από φίλτρο 0.22 μm. Η «φιλοσοφία» αυτής της δοκιμαστικής «καλλιέργειας» είναι ότι, εάν μέχρι την Ημέρα 4 που εκκινείται κανονικά η πραγματική καλλιέργεια, διαπιστωθεί μόλυνση, μπορεί να αποφευχθεί η άσκοπη έναρξη και διατήρησή της.

η. Καλλιέργεια Κυτταρικής Σειράς HEK293SGnTI⁻TetR[mSR-BI-t1]

Για πρακτικούς λόγους, ο χρόνος της καλλιέργειας αρχίζει να μετράται από την ημέρα που τα κύτταρα διανέμονται σε 50 τρυβλία 15cm, καθώς μετά από αυτή την ημέρα οι διαφορετικές φάσεις της καλλιέργειας είναι αυστηρώς καθορισμένες, χρονικά.

Ημέρα 1: Κύτταρα από δέκα τρυβλία διαμέτρου 15 cm, μετά την επεξεργασία τους με θρυψίνη όπως ανεφέρθη, αραιώνονται 5 φορές και μετά φέρονται σε νέα τρυβλία διαμέτρου 15cm. Χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο Α (χρειαζόμαστε περίπου 1250ml θρεπτικού μέσου για αυτή την καλλιέργεια).

Ημέρα 3: Αντικαθίσταται το θρεπτικό μέσο Α με νέο, όπου παραλείπεται το F12, ώστε να προετοιμαστούν τα κύτταρα για την καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα, η οποία γίνεται με θρεπτικό μέσο χωρίς F12. Μέχρι αυτό το στάδιο, όλα τα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά μέσα είναι τυποποιημένα και προέρχονται από την CELLGRO - τα ειδικό μέσο από την εταιρία Atlanta Biologicals χρησιμοποιείται μόνο για το βιοαντιδραστήρα. Σε περίπτωση που δεν γίνεται "δοκιμαστική λειτουργία" του βιοαντιδραστήρα, η ημέρα 3 είναι κανονικά η ημέρα που θα πλενόταν, θα συναρμολογείτο, θα αποστειρωνόταν η δεξαμενή και θα γινόταν βαθμονόμηση του μετρητή διαλυμένου O_2 και του pH-μέτρου, σύμφωνα με τα προηγούμενα πρωτόκολλα.

Ημέρα 4: Μεταφορά θρεπτικού μέσου και κυττάρων στο βιοαντιδραστήρα

- Προετοιμασία του θρεπτικού μέσου

Σε 4.35L ddH_2O, τα οποία συνήθως διαμοιράζονται σε δύο γυάλινα δοχεία χωρητικότητας 3L, προστίθενται τα ακόλουθα υλικά και αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου διαλυθούν:

65.8gr DMEM (Atlanta Biologicals)
18.5gr Sodium Bicarbonate (SIGMA)
15gr Primatone RL-UF

1.5gr Dextran Sulfate (SIGMA)

Το Primatone RL-UF είναι πηγή βραχέων πεπτιδίων που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ η Dextran Sulfate μειώνει τη συσσωμάτωση των κυττάρων.

Σημείωση: αυτές οι ποσότητες ισχύουν εάν δεν έχουμε κάνει τη "δοκιμαστική λειτουργία" που περιεγράφη πιο πάνω - εάν κάνουμε τη "δοκιμαστική λειτουργία" ήδη, από την ανωτέρω συνταγή αφαιρούμε τα υλικά που έχουμε προσθέσει ήδη στο βιοαντιδραστήρα, δηλαδή τα 15gr Primatone RL-UF [Quest International (Hoffman Estates, IL)] και ~5gr σκόνης DMEM [Atlanta Biologicals (Norcross, GA)] διαλυμένα σε 2L ddH_2O.

Τα δύο γυάλινα δοχεία χωρητικότητας 3L με τα διαλυμένα θρεπτικά μέσα καθώς και δύο αποστειρωμένα γυάλινα δοχεία χωρητικότητας 2L και φίλτρα χωρητικότητας 500ml μεταφέρονται στην απαγωγό. Μετά από διήθηση του θρεπτικού μέσου μέσω μεμβράνης 0.2μm με χρήση φίλτρων 500ml, αυτό συμπληρώνεται περαιτέρω με τα ακόλουθα αποστειρωμένα συστατικά, τα οποία προστίθενται απευθείας στα δοχεία 2L:

500ml FBS
100ml Penicillin/Streptomycin (100 units/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin)
50ml (292 μg/ml) L-Glutamine
5gr Pluronic F-68

Το Pluronic F-68 είναι μια χημική ένωση που μειώνει τις δυνάμεις τριβής ανάμεσα στα κύτταρα σε καλλιέργειες εναιώρησης.

Τα δύο αυτά δοχεία μεταφέρονται στη συνέχεια στο δωμάτιο του βιοαντιδραστήρα, και το θρεπτικό μέσο τοποθετείται στη δεξαμενή 14.4L, αφού πρώτα αφαιρεθεί από αυτήν το 1XPBS ή το ddH_2O (εκτός αν βρίσκεται σε εξέλιξη "δοκιμαστική λειτουργία", οπότε αυτά έχουν ήδη αφαιρεθεί). Σε αυτό το σημείο, ανοίγουμε τα στροφία των τριών αερίων (CO_2, N_2, O_2 από την BOC Gases) των οποίων η πίεση προσαρμόζεται στα 10 PSI.

Θέτουμε τους δείκτες “pH”, “DO” και “Temperature” στη ρύθμιση “P-I-D” στην οθόνη “MASTER” και την ένδειξη “Agitation” στις 30rpm. Τα pH, DO και T τίθενται κατά κανόνα στα 7,00, 50% και 37°C, αντίστοιχα. Το θερμόμετρο τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή του σκεπάστρου. Χρειάζονται 1-2 ώρες για να φτάσουν τα pH, DO και T, στις καθορισμένες τιμές. Όταν αυτό συμβεί, το θρεπτικό μέσο εμβολιάζεται με τα κύτταρα που συλλέγονται με τρυψινισμό των πενήντα τρυβλίων διαμέτρου 15cm. Τα κύτταρα μεταφέρονται αρχικά σε αποστειρωμένο δοχείο 500ml μέσα στην απαγωγό και από εκεί στο βιοαντιδραστήρα. Δείγμα της κυτταροκαλλιέργειας λαμβάνεται και μετράται η κυτταρική του πυκνότητα κάθε ημέρα προκειμένου να ελεγχθεί ο ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας.

Ημέρα 9: Η καλλιέργεια συμπληρώνεται με 50 ml διαλύματος γλυκόζης 20% (βάρος/όγκος) και 150 ml 10% (βάρος/όγκος) Primatone RL- UF. Τα διαλύματα προετοιμάζονται με διάλυση 10gr γλυκόζης και 15gr Primatone σε 200ml ddH_2O. Το διάλυμα διηθείται σε φίλτρο 0.22μm πριν την προσθήκη στην καλλιέργεια.

Ημέρα 10: Επάγεται η έκφραση του mSR-BI-t1 με προσθήκη 2 μg/ml τετρακυκλίνης (SIGMA ALDRICH) και 5 mM βουτυρικού νατρίου (SIGMA ALDRICH, #B5887). Η τετρακυκλίνη διαλύεται σε απεσταγμένο νερό και αποστειρώνεται με διήθηση σε φίλτρο 0.22 μm (το διάλυμα τετρακυκλίνης, είτε προετοιμάζεται εκ νέου για κάθε καλλιέργεια, ή ετοιμάζεται μία φορά, αποστειρώνεται με φίλτρο 0.22 μm και διαμοιράζεται σε κλάσματα τα οποία φυλλάσσονται στους -20°C και αποψύχονται για κάθε καλλιέργεια).

Ημέρα 12: Την 8η ημέρα από την έναρξή της, γίνεται τερματισμός της καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό, αντλούμε τα κύτταρα και το θρεπτικό μέσο από τη δεξαμενή και τα μεταφέρουμε σε κωνικούς σωλήνες 250ml, οι οποίοι τοποθετούνται στον πάγο. Τα κύτταρα πλένονται μια φορά μέσα στους σωλήνες των 250 ml με 1X PBS και ύστερα μεταφέρονται σε σωλήνες Falcon των 50 ml, όπου πλένονται μια φορά με 1X PBS/ 1X αναστολείς πρωτεασών Complete. Στη συνέχεια καταψύχωνται με υγρό άζωτο και φυλλάσσονται σε καταψύκτη -80°C, έως ότου χρησιμοποιηθούν. Κατά το κλείσιμο του βιοαντιδραστήρα, όλες οι λειτουργίες του διατηρούνται ως έχουν προκειμένου να

διατηρηθούν τα κύτταρα σε βέλτιστες συνθήκες για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρόνο. Μετά τη συλλογή των κυττάρων, κλείνουμε τις στρόφιγγες των τριών αερίων (CO_2, N_2 και O_2). Η λειτουργία της αεραντλίας δεν πρέπει να διακοπεί αμέσως – προκειμένου να αποφευχθεί η βλάβη της, πρέπει να αφεθεί να λειτουργήσει με τον πλαστικό σωλήνα που οδηγεί στην κύρια μονάδα αποσυνδεδεμένο, για τουλάχιστον 5 λεπτά πριν την κλείσουμε. Θέτουμε τις λειτουργίες "Agitation", "Feed", "Temperature", "pH" and "DO" στη θέση "OFF" και σβήνουμε την κύρια μονάδα από το διακόπτη ON/OFF. Ο ψύκτης του νερού κλείνεται τελευταίος. Ο μετρητής pH αφαιρείται από το σκέπαστρο, πλένεται με νερό βρύσης και τοποθετείται σε δοχείο με 1X PBS. Ομοίως, ο μετρητής διαλυμένου O_2 πλένεται με νερό βρύσης και αποθηκεύεται στο κουτί του.

θ. Αποσυναρμολόγηση και Πλύσιμο της Δεξαμενής 14.4L

Όταν τερματιστεί και συλλεγεί η καλλιέργεια, αποσυναρμολογείται και πλένεται η δεξαμενή 14.4L ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αρχικά αφαιρούνται τα φίλτρα από τις άκρες των σωλήνων (επειδή εάν διαβραχούν με νερό είναι πλέον ανενεργά και πρέπει να αντικατασταθούν). Επίσης, τα φύλλα αλουμινίου που καλύπτουν τους γυαλινους σωλήνες αφαιρούνται και απορρίπτονται. Το pH-μετρο αφαιρείται προσεκτικά από το σκέπαστρο, πλένεται με νερό και τοποθετείται σε δοχείο με 1X PBS. Επίσης ο μετρητής διαλυμένου O_2 αφαιρείται, πλένεται με νερό βρύσης και αποθηκεύεται στο κουτί του. Τα μικρότερα δοχεία που χρησιμεύουν για τη μεταφορά θρεπτικού μέσου και κυττάρων θα πρέπει να έχουν ήδη αποσυνδεθεί από την κύρια δεξαμενή του βιοαντιγραστήρα μετά τη χρήση τους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, και θα πρέπει να έχουν ήδη πλυθεί με νερό βρύσης και απορρυπαντικό TERGAZYME. Ξεβιδώνουμε το σκέπαστρο από τη δεξαμενή και το μεταφέρουμε στο νεροχύτη, όπου το πλένουμε με νερό βρύσης. Κατόπιν, πλένουμε με τον ίδιο τρόπο τη δεξαμενή. Η δεξαμενή μεταφέρεται πίσω στη βάση της και γεμίζεται με νερό βρύσης στο οποίο προστίθεται απορρυπαντικό "TERGAZYME" . Το σκέπαστρο προσαρμόζεται πάνω στη δεξαμενή χωρίς να βιδωθεί. Η δεξαμενή αφήνεται έτσι ολονυκτίως και την επόμενη μέρα, πλένεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει.

6. Εκτίμηση της Ποσότητας mSR-BI-t1 στην Κυτταρική Πελέτα HEK293SGnTI⁻ TetR[mSR-BI-t1]

Προκειμένου να εκτιμηθεί το περιεχόμενο της κυτταρικής πελέτας HEK293SGnTI⁻ TetR[mSR-BI-t1] σε mSR-BI-t1, ένα μικρό μέρος της (~0.5gr) λύεται με διάλυμα λύσης A [1.5% (w/v) Octyl Glucoside (ROCHE DIAGNOSTICS, # 10737674001), 15 mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών Complete Protease Inhibitors (ROCHE DIAGNOSTICS, #1 836 145) σε PBS, ~1ml] και στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάλυση Western σε 10ugr του κυτταρικού εκχυλίσματος που προκύπτει, σε 10ug κυτταρικού εκχυλίσματος από πελέτες που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για απομόνωση mSR-BI-t1 καθώς και σε διαφορετικές γνωστές ποσότητες απομονωμένου mSR-BI-t1. Συγκρίνοντας την ένταση των διαφορετικών ζωνών, εκτιμάται η ποσότητα της mSR-BI-t1 στην πελέτα (βλέπε αποτελέσματα).

.

Δ. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ mSR-BI-t1 ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΟΣΟΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

1. **Προετοιμασία Μονοκλωνικού Αντισώματος 1D4**

Το μονοκλωνικό αντίσωμα 1D4 παράγεται από κυτταρική σειρά υβριδώματος (ευγενική δωρεά από τον δρα P.J. Reeves και το εργαστήριο του καθηγητή G. Khorana στο M.I.T.) η οποία καλλιεργείται σε εναιώρηση σε βιοαντιδραστήρα και καθαρίζεται από την εταιρεία Cell Essentials. Το καθαρισμένο αντίσωμα, το οποίο βρίσκεται σε PBS, διαμοιράζεται μετά την παραλαβή του σε σωλήνες Falcon των 50ml και φυλάσσεται στους -80°C. Προκειμένου να συζευχθεί με τα σφαιρίδια σεφαρόζης, μεταφέρεται από τους -80°C στους 4°C, προκειμένου να επανέλθει σε υγρή φάση. Επειδή βρίσκεται μέσα σε 1X PBS, πρέπει να υποστεί διύλιση έναντι του διαλύματος σύζευξης (0.25M $NaHCO_3$, 0.5M NaCl, pH 8.3), στο οποίο πραγματοποιείται η πρόσδεσή του στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Έτσι, 50 ml διαλύματος 1D4 MAb σε 1X PBS διυλίζονται εναντι 2.5L του διαλύματος σύζευξης για τουλάχιστον 6 ώρες με τρεις αλλαγές στους 4°C με μεμβράνη διαπερατή σε σωματίδια έως 12-14kDa.

2. Προετοιμασία των Σφαιριδίων CNBr-Σεφαρόζης 4B

Τα σφαιρίδια CNBr-Sepharose 4B προέρχονται από την GE HEALTHCARE BIOSCIENCES (# 17-0430-01) και φυλάσσονται στους 4°C. Η σκόνη πλένεται σε γυάλινο ηθμό (sintered glass filter) με 1mM HCl (~ 200ml 1mM HCl ανά γραμμάριο λυοφιλοποιημένης σκόνης, που προστίθεται σε δόσεις), προκειμένου να μετατραπεί σε πηκτή και να ενεργοποιηθεί για τη σύζευξή της με το αντίσωμα. Οι πλύσεις πρέπει να γίνονται γρήγορα και η πηκτή πρέπει να αναδεύεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας με γυάλινη ή μεταλλική ράβδο. 1gr ξηράς σκόνης σφαιριδίων CNBr-Σεφαρόζης είναι ισοδύναμο με ~ 3.5ml σφαιριδίων σε μορφή πηκτής.

3. Σύζευξη 1D4 – Σφαιριδίων Σεφαρόζης

Κατά τη σύζευξη χρησιμοποιούνται 10mg 1D4 ανά 1ml πηκτής CNBr-Σεφαρόζης 4B. Η σύζευξη πραγματοποιείται με ανάδευση για 1 ωρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ολονυκτίως στους 4°C. Μετά τη σύζευξη, τα σφαιρίδια αφήνονται να καθιζάνουν με τη δύναμη της βαρύτητας. Το υπερκείμενο θα πρέπει να περιέχει λιγότερο από 5% της συνολικής πρωτεΐνης. Μετά τον έλεγχο αυτό, το υπερκείμενο απορρίπτεται. Προστίθεται διάλυμα 1M Αιθανολαμίνης, pH8, όγκου ίσου με αυτόν του απορριμμένου υπερκειμένου, προκειμένου να τερματιστεί η σύζευξη. Το μίγμα αναδεύεται ολονυκτίως στους 4°C. Η πηκτή πλένεται σε γυάλινο ηθμό 4 φορές με εναλλασσόμενα διαλύματα σύζευξης (0.25M $NaHCO_3$, 0.5M NaCl, pH 8.3) και 0.1M NaOAc, 0.5M NaCl, pH4. Τέλος προστίθεται 1X PBS που περιέχει 0.05% της βακτηριοστατικής ένωσης NaN_3 (SIGMA ALDRICH, Cat.# 438456), σε όγκο ίσο με αυτόν της πηκτής. Η πηκτή 1D4 – Σφαιριδίων Σεφαρόζης φυλάσσεται στους 4°C.

4. Εκτίμηση της Ικανότητας των Σφαιριδίων 1D4-Σεφαρόζης να Δεσμεύουν mSR-BI-t1

Η ικανότητα των σφαιριδίων 1D4-σεφαρόζης να δεσμεύουν mSR-BI-t1 εκτιμάται με επώαση διαφορετικών όγκων σφαιριδίων με συγκεκριμένη ποσότητα απομονωμένης

mSR-BI-t1. Για παράδειγμα, επωάζονται 10 μg απομονωμένου mSR-BI-t1 με 5, 10, 15 και 20 μl σφαιριδίων σε σωλήνες Eppendorf, με ισχυρή ανάδευση, για 3 hr στους 4°C. Μετά από φυγοκέντρηση των σωλήνων επί 5 min σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 15000 rpm, 25 μl του υπερκειμένου κάθε μίγματος ηλεκτροφορείται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης 8%. Μετά από χρώση της πηκτής με χρωστική Coomasie, διαπιστώνεται σε ποιό μίγμα σφαιριδίων/πρωτεΐνης έγινε πλήρης δέσμευση του mSR-BI-t1 από τα σφαιρίδια, καθώς στην αντίστοιχη λωρίδα της πηκτής εξαφανίζεται η ζώνη του mSR-BI.-t1. Για παράδειγμα, αν αυτό συμβεί στο μίγμα που περιλαμβάνει 10 μl σφαιριδίων, αυτό σημαίνει ότι η ικανότητα δέσμευσής τους είναι 1μg mSR-BI-t1/μl πηκτής σεφαρόζης/1D4 (βλέπε αποτελέσματα).

5. Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας Μεγάλης και Μικρής Κλίμακας για την Απομόνωση του mSR-BI-t1

Το κυτταρικό ίζημα HEK293SGnTI^{-}TetR[mSR-BI-t1] μεταφέρεται από τους –80°C στους 4ºC. Όλοι οι πιο κάτω χειρισμοί πραγματοποιούνται στους 4ºC και σε κάθε βήμα φυλάσσονται κλάσματα προκειμένου να προσδιοριστεί στο τέλος η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Το ίζημα αναμειγνύεται με 1ml/0.1gr (υγρό βάρος) διάλυμα κυτταρικής λύσης Α [1.5% (w/v) Octyl Glucoside (ROCHE DIAGNOSTICS, # 10737674001), 15 mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών Complete Protease Inhibitors (ROCHE DIAGNOSTICS, #1 836 145) σε PBS] για 1hr, με περιστροφική κίνηση ή ισχυρή ανάδευση. Για μεγάλης κλίμακας καθαρισμό, η λύση γίνεται σε κωνικούς σωλήνες 250 ml, ενώ για μικρής κλίμακας καθαρισμό, μπορεί να γίνει σε σωλήνες Falcon 15 ml ή 50 ml.

Προκειμένου να απομακρυνθούν τα στερεά συστατικά, το μίγμα φυγοκεντρείται με επιτάχυνση 13,300g για 20 λεπτά (DuPont Instruments, SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) και η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα. Προκειμένου για πολύ μικρής κλίμακας καθαρισμό από το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε από τη λύση των κυττάρων ενός τρυβλίου διαμέτρου 15 cm, το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε σωλήνες Falcon 15ml ή 50ml, ενώ για μεγάλης κλίμακας

καθαρισμό, το εκχύλισμα μεταφέρεται σε κωνικούς σωλήνες 250ml. Στο κυτταρικό αυτό εκχύλισμα προστίθενται σφαιρίδια 1D4-σεφαρόζης και ακολουθεί ανάμειξη με περιστροφική κίνηση ή ανάδευση για 2 hrs. Ο όγκος των σφαιριδίων εξαρτάται από την ικανότητα δέσμευσής τους (η οποία εκτιμάται όπως περιγράφεται πιο πάνω), σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα του κυτταρικού εκχυλίσματος σε mSR-BI-t1. Το μίγμα μεταφέρεται σε στήλη πολυπροπυλενίου (PIERCE, # 29920, 29922, 29924) [για μικρής κλίμακας καθαρισμό, το μίγμα μεταφέρεται σε φίλτρα φυγοκέντρησης (spinner filters) τύπου Ultrafree-MC (MILLIPORE, # UFC30DV25) και διηθείται με φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 4,000 rpm για 1 λεπτό]. Ακολουθούν πλύσεις των σφαιριδίων στη στήλη με διάλυμα λύσης Α, 50πλάσιου όγκου σε σχέση με τον όγκο των σφαιριδίων και μετά με διάλυμα στήλης (column buffer) (20 mM Hepes (pH 7.3), 1.5% octyl glucoside, 15 mM NaCl και 1X Complete protease inhibitors), όγκου δεκαπλασίου σε σχέση με τον όγκο των σφαιριδίων (για μικρής κλίμακας καθαρισμό, προστίθενται 500μl διαλύματος Α στα φίλτρα φυγοκέντρησης και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 4,000 rpm για 5 λεπτά - πραγματοποιούνται 10 τέτοιες πλύσεις). Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια αναμειγνύονται με περιστροφική κίνηση, με δύο όγκους στήλης, διάλυμα έκλουσης (διάλυμα στήλης συν 200 μM του πεπτιδίου TETSQVAPA, το οποίο προετοιμάζεται από το Massachusetts Institute of Technology Biopolymer Laboratory) επί 1 ώρα (για μικρής κλίμακας καθαρισμό τα σφαιρίδια επωάζονται μέσα στα φίλτρα με 50μl διαλύματος έκλουσης, για μία ώρα και με περιοδική ανάδευση του μίγματος ανά 15 λεπτά). Ακολουθεί έκλουση του mSR-BI-t1 με τη βαρύτητα και συλλογή των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε σωλήνες Falcon. Για μικρής κλίμακας καθαρισμό, η έκλουση πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 5,000 rpm για 5 λεπτά και συλλογή των δειγμάτων mSR-BI-t1 σε σωλήνες Eppendorf. Τόσο για μικρής όσο και για μεγάλης κλίμακας καθαρισμό, πραγματοποιούνται 5 κύκλοι επώασης και έκλουσης.

Ε. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ^{125}I-HDL/LDL ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ [^{3}H]-ΑΙΘΕΡΩΝ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (CE) ΑΠΟ [^{3}H]CE-HDL/LDL ΑΠΟ mSR-BI-t1 ΑΝΑΣΥΣΤΗΜΕΝΟ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

1. Παρασκευή Λιποσωμάτων

Τα λιπίδια (L-a-Phosphatidylcholine, Avanti Polar Lipids, # 830051 / Sphingomyelin, Avanti Polar Lipids, # 860061 / Cholesterol, SIGMA-ALDRICH, # C8667) διαλύονται σε χλωροφόρμιο στην επιθυμητή μοριακή αναλογία και ξηραίνονται με ρεύμα N_2. Στη συνέχεια, επαναδιαλύονται με διάλυμα επαναδιάλυσης (50 mM Tris/HCl pH 6) με επανειλημένη αναρρόφηση, σε συγκέντρωση 2 mg/ml και φυλάσσονται στους 4^oC.

2. Παρασκευή Πρωτεολιποσωμάτων

Η απομονωμένη mSR-BI-t1 μεταφέρεται από τους -20^oC στον πάγο, όπου αφήνεται να έλθει σε υγρή φάση και ύστερα φυγοκεντρείται στις 14,000 g για 5 min. Όλα τα διαλύματα, η απομονωμένη πρωτεΐνη mSR-BI-t1, καθώς και οι σωλήνες που χρησιμοποιούνται για την επακόλουθη φυγοκέντρηση (oak ridge centrifuge tubes, οι οποίοι είναι πιο ανθεκτικοί στην ακετόνη), διατηρούνται στον πάγο. Μέσα στους σωλήνες oak ridge που βρίσκονται στον πάγο, αναμιγνύονται 2.4 ml διαλύματος B (50mM Tris, pH6.0, 150mM NaCl, 2mM $CaCl_2$), 0.5 ml λιποσωμάτων και 10μg καθαρής mSR-BI-t1. Στο μίγμα αυτό προστίθενται 0.6 όγκοι ακετόνης που διατηρείται στον πάγο. Ακολουθεί ανάμιξη του μίγματος και φυγοκέντρηση στα 30g (σε στροφέα SS34 αυτό ισοδυναμεί με 16000 rpm) για 25min στους 4^0C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι σωλήνες αφήνονται στον πάγο ανεστραμμένοι για 10min, προκειμένου να απομακρυνθεί τελείως η υγρή φάση. Το ίζημα των πρωτεολιποσωμάτων επαναδιαλύεται σε 375 μl διαλύματος επαναδιάλυσης (20mM Tris pH8, 1 mM $CaCl_2$, 20 mM NaCl) και οι σωλήνες αφήνονται στον πάγο.

3. Δοκιμασία Πρόσδεσης ^{125}I-HDL/LDL ή Πρόσληψης [^{3}H]-Αιθέρων Χοληστερόλης (CE) από [^{3}H]-CE HDL/LDL

Σε τρυβλία 96 πηγαδιών (96 well V-shaped plates, Linbro/Titertek/flowlabs, # 76-223-05) προστίθενται 20 ul διαλύματος C (20 mM Tris pH8, 2 mM $CaCl_2$, 80mg/ml fat free BSA), 10ul πρωτεολιποσωμάτων και 10μl ^{125}I-HDL/LDL ή [^{3}H]-CE-HDL/LDL σε

τελική συγκέντρωση 10 μgr/ml. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 40ul. Οι αντιδράσεις επωάζονται για 2hrs στους 37°C.

4. Πλύσεις των Φίλτρων και Μέτρηση της Φυσικής των Ραδιενέργειας

Για την πλύση των φίλτρων όπου θα μεταφερθούν οι αντιδράσεις, χρησιμοποιείται ένα σύστημα κενού αέρος (1225 Sampling Manifold MILLIPORE CORP, #XX27 025 50). Αρχικά το σύστημα πλένεται με νερό χωρίς τα φίλτρα. Στη συνέχεια, οι θέσεις όπου θα τοποθετηθούν τα φίλτρα πλένονται με 1 ml διαλύματος πλύσης (20 mM Tris pH 8, 20μM $CaCl_2$, 50 mM NaCl, 1mg/ml fatty acid-free BSA). Ύστερα τοποθετούνται τα φίλτρα (MILLIPORE CORP, # HAWP02500), τα οποία έχουν προ-υγρανθεί σε διάλυμα πλύσης για 1hr. Τα φίλτρα πλένονται 2X με 1ml διαλύματος πλύσης. Το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού μεταφέρεται επάνω στα φίλτρα, τα οποία πλένονται 6X με 1ml διαλύματος πλύσης. Τα φίλτρα παραλαμβάνονται με λαβίδα και τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι μεταφέρονται σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (Perkin Elmer Wizard 1470 Automatic Gamma Counter) ή σπινθηρισμού (TRI-CARB PACKARD 1900 TR Liquid Scintillation Analyzer), προκειμένου να μετρηθεί η ραδιενέργειά τους.

Z. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ^{125}I-HDL ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ [^{3}H]-ΑΙΘΕΡΩΝ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (CE) ΑΠΟ [^{3}H]CE-HDL ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ SR-BI

Προκειμένου για κύτταρα HEK που διαμολύνονται παροδικά με πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν τον SR-BI, την πρώτη μέρα επιστρώνονται 150,000 κυττάρων ανά πηγάδι σε 0.5ml θρεπτικού μέσου Α (εναλλακτικά μπορεί να παραλειφθούν τα αντιβιοτικά). Χρησιμοποιούνται τρυβλία επιστρωμένα με πολυ-λυσίνη, τα οποία παρέχουν καλύτερη κυτταρική πρόσδεση. Προκειμένου για κυτταρική σειρά CHO που εκφράζει σταθερά τον SR-BI, την πρώτη μέρα μεταφέρονται 60 χιλιάδες κύτταρα ανά πηγάδι σε τρυβλία 24 θέσεων και σε 1.5ml θρεπτικού μέσου (θρεπτικό μέσο Α που όμως περιλαμβάνει 5% και όχι 10%, FBS).

Τη δεύτερη μέρα και προκειμένου για κύτταρα HEK, αυτά πλένονται με 1X DMEM/F12 1:1 με 5% FBS. Ακολουθεί παροδική διαμόλυνση με πλασμιδιακή κατασκευή έκφρασης του mSR-BI-t1 (pmSR-BI-t1) με τη μέθοδο Lipofectamine, η οποία περιεγράφη πιο πάνω.

Την τέταρτη μέρα, προκειμένου για παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα HEK (ή την τρίτη μέρα, προκειμένου για σταθερή κυτταρική σειρά CHO), πραγματοποιείται η δοκιμασία πρόσδεσης ^{125}I-HDL και πρόσληψης [^{3}H]-CE από τα κύτταρα, ως εξής:

Τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με cPBS, 1ml ανά θέση, ή πλένονται την πρώτη φορά με 1ml, cPBS και τη δεύτερη με 1ml Ham's, 50 units/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, 2mM L-Glutamine. Προστίθεται 0.5 ή 0.25ml ανά πηγάδι θρεπτικό μέσον Ham's F-12 με 0.5% BSA (>=97% Agarose Gel Electrophoresis #A7511-256, Sigma) χωρίς λιπαρά οξέα και με ^{125}I-HDL (με ή χωρίς μη-σημασμένη HDL). Ακολουθεί επώαση δύο ωρών στους 37°C. Εν συνεχεία, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό , τα πηγάδια πλένονται δύο φορές με διάλυμα Tris-BSA [0.05M Tris-HCl, pH7.4, 15mM NaCl, 2mg/ml BSA (Sigma, A-6003)] και άλλες δύο φορές με διάλυμα Tris (0.05M Tris-HCl, pH7.4, 15mM NaCl) (1 ml ανά πηγάδι). Τα κύτταρα λύονται με προσθήκη 0.5ml ή 0.75ml 0.1N NaOH και επώαση επί τουλάχιστον 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Παραλαμβάνονται 0.25ml για μέτρηση σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (Packard Instrument Co., Meriden, CT) και για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry. Η δοκιμασία πρόσληψης [^{3}H]-CE-HDL είναι παρόμοια με τη δοκιμασία πρόσδεσης της ^{125}I-HDL, εκτός από τις ακόλουθες αλλαγές: πριν από τη λύση των κυττάρων με NaOH προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλης και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 min υπό ανάδευση, προκειμένου να εξαχθούν τα μόρια [^{3}H]-αιθέρων χοληστερόλης από τα κύτταρα.

Η. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ HDL ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

1. Λήψη Αίματος και Απομόνωση Πλάσματος από Ποντικούς και από Άνθρωπο

Τα ποντίκια ακινητοποιούνται και αναισθητοποιούνται με ένεση 0.4-0.8ml Avertin (Tribromoethanol, Aldrich). Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται σύριγγα 1 ml (μία σύριγγα ανά ποντίκι), η οποία αποπλύνεται με ηπαρίνη (heparin coated). Η καρδιά του ποντικού διατρείται μέσω του στέρνου και από κάθε ποντικό απομονώνονται περίπου 0.8-1 ml αίματος, μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf (ένας σωλήνας/ποντικό) και τοποθετούνται σε πάγο. Το αίμα εν συνεχεία φυγοκεντρείται στις 5000 στροφές/λεπτό σε φυγόκεντρο πάγκου για 15 λεπτά. Προκειμένου να απομονωθεί ικανή ποσότητα HDL για την πραγματοποίηση των περιγραφόμενων πειραμάτων αλληλεπίδρασης HDL/SR-BI σε κύτταρα και λιποσώματα, απαιτούνται περίπου 12-15 ποντικοί.

Από άνθρωπο ελήφθησαν περίπου 25 ml αίματος το οποίο υπέστη ακριβώς την ίδια επεξεργασία που περιγράφεται για το αίμα των ποντικών.

2. Απομόνωση HDL με Υπερφυγοκέντριση Κλασμάτωσης Πυκνότητας

Σε 1 ml ορού αίματος τοποθετούνται 0.4 ml ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος σε φυσιολογικό διάλυμα NaCl (phosphate-buffered saline) για να γίνει ο συνολικός όγκος 1.4ml και η πυκνότητα του μίγματος προσαρμόζεται στα 1.23 g/ml με προσθήκη βρωμιούχου καλίου (KBr) (0.325 mg KBr/ ml PBS). Σε αυτό το διάλυμα ορού προστίθενται διαδοχικά και σε στρώματα, τα εξής διαλύματα KBr σε PBS: 0.8 ml 1.21 g/ml KBr, 2.2 ml 1.063 g/ml KBr, 0.5 ml 1.019 g/ml KBr και 0.5 ml PBS-φυσιολογικό διάλυμα NaCl. Το μίγμα αυτό ετοιμάζεται (σε σωλήνες Fisher, NC 915 7569). Οι σωλήνες τοποθετούνται σε κουβαδάκια φυγοκέντρησης (centrifuge buckets), εξισορροπούνται σε βάρος με τα εκ διαμέτρου αντίθετα κουβαδάκια και φυγοκεντρούνται για 22 ώρες σε υπερφυγόκεντρο με στροφίο SW-41 στις 30,000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση, συλλέγονται 10 κλάσματα του 0.5 ml, μετράται από την κορυφή προς τον πυθμένα ο δείκτης διάθλασης για τον προσδιορισμό της πυκνότητας των κλασμάτων και εν συνεχεία τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Τα κλάσματα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε HDL αναμειγνύονται και χρησιμοποιούνται για πειράματα όπως περιγράφεται κατωτέρω.

3. Ιωδίωση της HDL

Η ιωδίωση της HDL με ^{125}I πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ιωδοσφαιριδίων της εταιρείας Pierce (Pierce iodobead method). Το ραδιενεργό ιώδιο μπορεί να ενσωματωθεί σε πρωτεΐνες, είτε ενζυματικά ή με χημική οξείδωση. Στη δεύτερη περίπτωση, το $Na^{125}I$ μετατρέπονται στην ενεργό μορφή τους με ένα μέσο οξείδωσης, το οποίο στην προκειμένη περίπτωση είναι το *N*-chloro-benzenesulfonamide. Η ένωση αυτή βρίσκεται προσδεδεμένη σε σφαιρίδια πολυστυρενίου. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι εν συντομία η εξής:

α. Αμέσως πριν τη χρήση, τα σφαιρίδια πλένονται με 500 μl PBS-saline ανά σφαιρίδιο και στεγνώνονται σε διηθητικό χαρτί.

β. Τα σφαιρίδια προστίθενται σε διάλυμα $Na^{125}I$ (περίπου 1 mCi ανά 100 μg πρωτεΐνης) αραιωμένου με PBS–saline και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά.

γ. Η HDL προστίθεται σε PBS- saline και το μίγμα μεταφέρεται στο δοχείο αντίδρασης (π.χ. Reacti-Vial™ Small Reaction Vial, Product No. 13222 ή 13223). Η αντίδραση επωάζεται για 2-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

δ. Η αντίδραση τερματίζεται με αφαίρεση του περιεχομένου από το δοχείο της αντίδρασης. Όταν τα σφαιρίδια διαχωρίζονται από το διάλυμα, η αντίδραση διακόπτεται.

ε. Για την αφαίρεση του πλεονάζοντος $Na^{125}I$ ή μη-συνεζευγμένου ^{125}I μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες φυγοκέντρησης Zeba™ Desalt Spin Columns (π.χ., Product No. 89891). Εναλλακτικά, η ιωδιωμένη πρωτεΐνη μπορεί να υποστεί διύλιση έναντι κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, όπως PBS-saline, με τη χρήση π.χ. κασέτας διύλισης Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette (Product No. 66382).

4. Σήμανση HDL με [^{3}H] Αιθέρες Χοληστερόλης

Η σήμανση της HDL με [^{3}H] αιθέρες χοληστερόλης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των Rodrigueza *et al.* (205) με ελάχιστες τροποποιήσιες. Εν συντομία, 5 mg HDL, 240 mg πλάσματος ελεύθερου λιποπρωτεινών, 0.01% απροτινίνης, 0.01% γλουταθειόνης και 25-40 μCi [^{3}H] αιθέρων χοληστερόλης ([^{3}H]CE) (Amersham) προστέθηκαν σε αιθανόλη και αναμείχθηκαν σε σωλήνα πολυπροπυλενίου. Ο σωλήνας εν συνεχεία ετέθη υπό ατμόσφαιρα N_2, εσφραγίσθη το μίγμα και επωάστηκε για 40 ώρες στους 37°C. Κατά την επώαση αυτή, μέρος των ραδιοσημασμένων αιθέρων χοληστερόλης ενσωματώνεται στον πυρήνα ουδετέρων λιπιδίων της HDL, η, δε περίσσεια αιθέρων χοληστερόλης μπορεί να απομακρυνθεί με υπερφυγοκέντρηση (225,000 × *g*) (ή εναλλακτικά διαπίδυση). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης της HDL μετά τη σήμανσή της με ^{125}I ή [^{3}H]CE προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry (βλέπε παράγραφο Β1).

Γ. Αποτελέσματα

1. Κατασκευή Σταθερής Κυτταρικής Σειράς HEK που Υπερεκφράζει Επαγώμενα τον mSR-BI-t1 με Περιορισμένη και Ομοιογενή Γλυκοζυλίωση

Α. Κατασκευή Πλασμιδίου pACMV-tetO-mSR-BI-t1

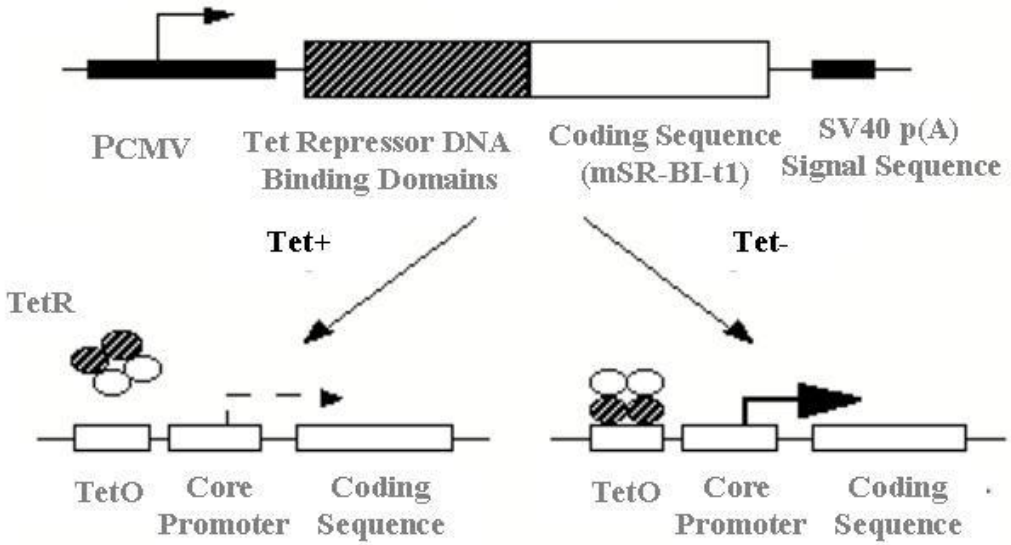
Το cDNA του mSR-BI-t1 (Εικ.2) κωδικοποιεί την πλήρους μήκους πρωτεΐνη mSR-BI και έχει προστεθεί στο καρβοξυ-τελικό τμήμα του η ακολουθία που κωδικοποιεί τον πεπτιδικό επίτοπο t1 (t1: TETSQVAPA), ο οποίος αντιστοιχεί στο καρβοξυ-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης ροδοψίνης και χρησίμευσε για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας. Το mSR-BI-t1 εκτμήθηκε από το πλασμίδιο pcDNAmSR-BI-t1 (Εικ. 4) (137) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και XhoI, και απομονώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Το ~1.5kb *Kpn*I/*Xho*I τμήμα κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης θηλαστικών pACMV-tetO (206). Το πλασμίδιο που προέκυψε ονομάσθηκε pACMV-tetO-mSR-BI-t1 (Εικ.4B). Το αρχικό πλασμίδιο pACMV-tetO παραχωρήθηκε ευγενώς από τον Dr. P.J. Reeves από το εργαστήριο του καθηγητή H.B.Khorana στο Τεχνολογικό Ινστιτούτο της Μασσαχουσέττης, περιλαμβάνει τον ισχυρό υποκινητή του CMV ο οποίος προωθεί την έκφραση του κλωνοποιημένου cDNA του mSR-BI-t1. Επίσης, περιλαμβάνει γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη, που χρησιμεύει για την επιλογή κλώνων με το αντιβιοτικό G418 κατά την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών (βλέπε 'Υλικά και Μέθοδοι'). Η έκφραση του γονιδίου ελέγχεται από έναν σχετικά αδύναμο υποκινητή (PH^2Ld).

Το γονίδιο mSR-BI-t1 κλωνοποιήθηκε πιο κάτω από τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού, που περιλαμβάνει δύο αλληλουχίες *tetO* (tet Operator). Σε αυτές τις αλληλουχίες προσδένεται η πρωτεΐνη TetR (Tet Repressor, καταστολέας Tet), η οποία εκφράζεται σταθερά από την κυτταρική σειρά HEK293SGnTI⁻TetR (206, 207), στην οποία επιθυμούμε να υπερεκφράσουμε τον mSR-BI-t1. Η πρόσδεση της TetR

καταστέλλει την έκφραση του mSR-BI-t1. Η καταστολή αυτή αίρεται μόνο μετά την προσθήκη τετρακυκλίνης, η οποία εκτοπίζει την TetR από τις αλληλουχίες tetO (Εικ.5).

Το πλασμίδιο pACMV-tetO-mSR-BI-t1 χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων *Escherichia coli* και την επιλογή κλώνων ανθεκτικών στην αμπικιλλίνη. Μετά από απομόνωση και καλλιέργεια των κλώνων προσδιορίστηκε η ακολουθία του ενθέματος που περιλαμβάνει το mSR-BI. Ένας από τους κλώνους με την προβλεπόμενη αλληλουχία ονομάστηκε pACMV-tetO-mSR-BI-t1 και χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών HEK293S GnTI⁻ TetR [mSR-BI-t1] (βλέπε πιο κάτω).

Tet-on system



Εικ. 5. Σχηματική Παράσταση του Συστήματος TetON. Η Ρυθμιστική Περιοχή TetO του DNA Είναι Θέση Πρόσδεσης του Καταστολέα TetR (Tet Repressor). Η Πρόσδεση Γίνεται Απουσία Τετρακυκλίνης. Παρουσία Τετρακυκλίνης ο TetR Αποσυνδέεται από τον TetO και Έτσι Επιτρέπει τη Μεταγραφή του Επιθυμητού Γονιδίου (Coding Sequence)

Β. Παροδική Έκφραση του mSR-BI-t1 σε Αγρίου Τύπου και Μεταλλαγμένες Κυτταρικές Σειρές HEK293S και Δοκιμασία Πρόσληψης DiI-HDL από Κύτταρα που Εκφράζουν τον SR-BI

Προκειμένου να διερευνηθεί το επίπεδο έκφρασης του mSR-BI-t1 σε διάφορες κυτταρικές σειρές HEK293S, αλλά κυρίως στην HEK293SGnTI$^{(-)}$TetR, η οποία αποτελεί την κυτταρική σειρά-στόχο για τη σταθερή διαμόλυνση με το πλασμίδιο που εκφράζει τον mSR-BI-t1, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τις δύο διαφορετικές πλασμιδιακές κατασκευές, pmSR-BI-t1 και pACMV-tetO-mSR-BI-t1, με χρήση LipofectAMINE (βλέπε «Υλικά και Μέθοδοι»).

Η HEK293SGnTI$^{(-)}$TetR αποτελεί την κυτταρική σειρά-στόχο διότι α) φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο GnTI, το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό N-γλυκανών στα ευκαρυωτικά κύτταρα και η απουσία της δράσης του έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή όλων των N-γλυκανών στη μορφή (GlcNAc)2(Man)5 (βλέπε «Εισαγωγή»). Επομένως οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες έχουν περιορισμένη και ομοιογενή γλυκοζυλίωση, πράγμα που θεωρείται πρόσφορο για τη διαδικασία της κρυστάλλωσης, β) εκφράζει σταθερά την πρωτεΐνη-καταστολέα TetR. Επομένως, μετά τη διαμόλυνση με το πλασμίδιο pACMV-tetO-mSR-BI-t1, φέρει σύστημα TetON (βλέπε πιο πάνω και «Εισαγωγή»), το οποίο επιτρέπει επαγώμενη έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου (mSR-BI-t1) παρουσία τετρακυκλίνης. Η επαγωγή της έκφρασης με προσθήκη τετρακυκλίνης γίνεται στη φάση της κυτταροκαλλιέργειας όπου έχουμε τη μέγιστη κυτταρική πυκνότητα. Έτσι, μεγιστοποιείται η παραγωγή mSR-BI-t1 και παρακάμπτεται το ανεπιθύμητο φαινόμενο συσσωμάτωσης (aggregation) των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε στο παρελθόν σε αγρίου τύπου κύτταρα HEK293S που εκφράζουν mSR-BI-t1 σε καλλιέργειες εναιώρησης, με αποτέλεσμα να περιορίζεται σημαντικά η μέγιστη κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας και επομένως η παραγωγή του mSR-BI-t1, γ) είναι μια ευκαρυωτική κυτταρική σειρά η οποία έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιεί σύμπλοκες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως π.χ. η γλυκοζυλίωση και δ) έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την υπερέκφραση και απομόνωση σε μεγάλες ποσότητες και άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως η ροδοψίνη (207).

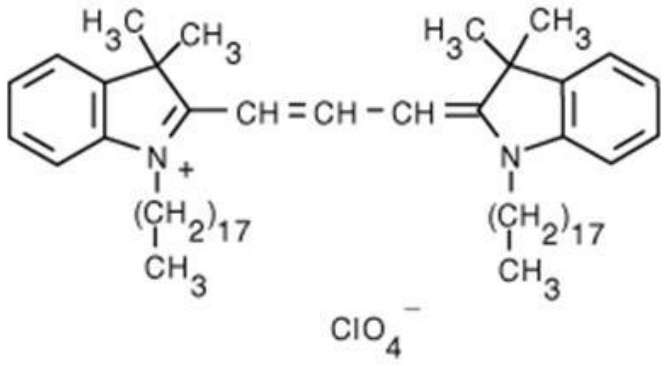
Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές κυτταρικές σειρές HEK293S: α) η αγρίου τύπου (WT) HEK293S όπου το pmSR-BI-t1 συνδιαμολύνθηκε με το πλασμίδιο pRSVTag (ευγενική δωρεά από τον δρα P.J. Reeves και το εργαστήριο του καθηγητή H.B. Khorana), το οποίο εκφράζει την πρωτεΐνη SV40 large tumor (T) antigen, η οποία προωθεί την αντιγραφή του pCDNA3-SR-BI-t1], β) η HEK293S TetR, η οποία εκφράζει τον καταστολέα Tet (Tet Repressor, TetR), γ) η HEK293S GnTI^{-}, η οποία φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο GnTI (N-acetyl Glucosaminyl Transferase I) και δ) η HEK293S GnTI^{-} TetR, η οποία φέρει τη μετάλλαξη στο γονίδιο GnTI και εκφράζει τον TetR και αποτελεί την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα πειράματα.

Ακολούθησε έλεγχος του επιπέδου έκφρασης του mSR-BI-t1 με τη δοκιμασία πρόσληψης DiI από τη DiI-HDL. Η DiI-HDL αποτελείται από HDL που φέρει τη φθορίζουσα ένωση DiI (DiI: 1,1',di-octadecyl-3,3,3'3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Εικ. 6Α), που είναι μια καρβοκυανίνη προσδεδεμένη στο φωσφολιπιδικό «κέλυφος» της HDL. Η DiI προσλαμβάνεται μέσω του SR-BI από κύτταρα που εκφράζουν SR-BI (13) και η παρατήρησή τους με μικροσκόπιο φθορισμού επιτρέπει την έμμεση εκτίμηση του επιπέδου έκφρασης του υποδοχέα.

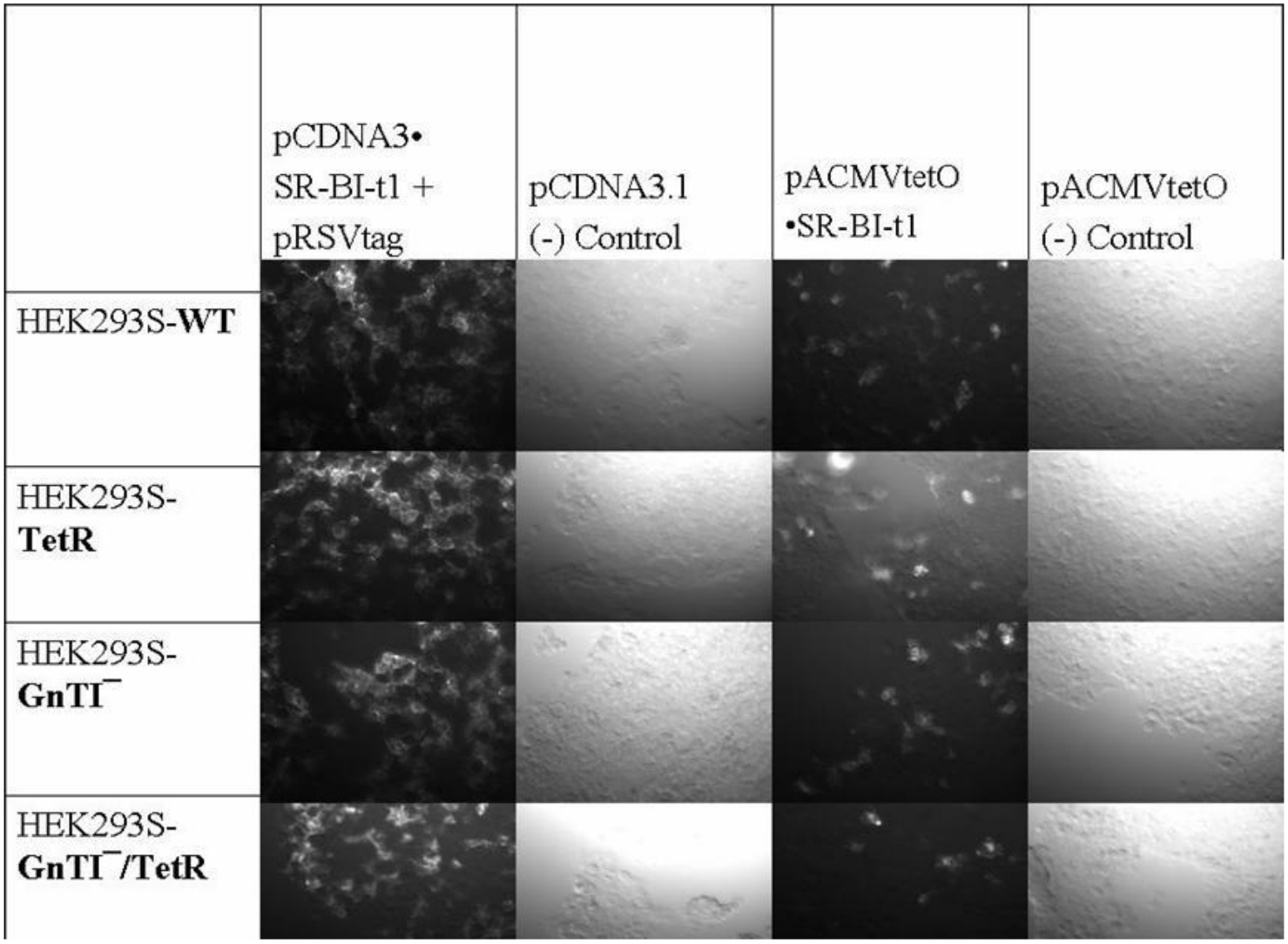
Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας έδειξαν ότι ο mSR-BI-t1 εκφράζεται περίπου ισοδύναμα σε όλες τις κυτταρικές σειρές μετά από παροδική τους διαμόλυνση, είτε με το πλασμίδιο pACMV-tetO-mSR-BI-t1 (Εικ. 6Β, στήλη 3) ή με το πλασμίδιο pmSR-BI-t1 (Εικ. 6Β, στήλη 1). Επομένως, η διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης (που οδήγησε στο φαινότυπο GnTI^{-}) καθώς και η σταθερή διαμόλυνση με το πλασμίδιο που εκφράζει τον καταστολέα TetR, δεν φαίνεται να επηρέασαν δυσμενώς την ικανότητα των κυτταρων HEK293S, να εκφράζουν τον mSR-BI-t1. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν ενθαρρυντικό για την επακόλουθη σταθερή διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK293SGnTI^{-}TetR, προκειμένου να επιτευχθεί υψηλού επιπέδου, επαγώμενη έκφραση του SR-BI.

Γ. Κατασκευή Σταθερής Κυτταρικής Σειράς HEK293S GnTI^{-} TetR [mSR-BI t1]

Για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν το mSR-BI-t1 μετά την επιμόλυνση των κυττάρων HEK293SGnTI¯TetR έγινε επιλογή με G418 (Geneticin). Αποικίες με ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη που ταυτόχρονα εκφράζουν το SR-BI στις οποίες η πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει το cDNA του SR-BI, έχει εντεθεί σε



Εικ. 6Α. Δομή της Καρβοκυανίνης DiI (DiI : 1,1',di-octadecyl-3,3,3'3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)



Εικ. 6Β. Παροδική Διαμόλυνση Κυτταρικών Σειρών HEK με Πλασμίδια Έκφρασης για τον mSR-BI-t1 και Εκτίμηση των Επιπέδων Έκφρασης του Υποδοχέαμε τη Δοκιμασία Πρόσληψης DiI-HDL

μεταγραφικά ενεργές περιοχές, απεμονώθησαν και εχρησιμοποιήθησαν για περαιτέρω πειράματα.

Συνοπτικά, κύτταρα HEK293SGnTI¯TetR διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pACMV tetO [mSR-BI-t1] με χρήση LipofectAMINE («Υλικά και Μέθοδοι») και διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο A [Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 (1:1) με 50 μονάδες/ml πενικιλλίνης, 50 μg/ml στρεπτομυκίνης, 2 mM γλουταμίνης και 10% εμβρυικού βόειου ορρού, Fetal Bovine Serum (FBS)], με 250μg/ml G418 κατά την πρώτη εβδομάδα και 500μg/ml G418 κατά τη δεύτερη εβδομάδα. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε θάλαμο επώασης με 95% αέρα και 5% CO_2 στους 37°C. Ως δοκιμασία αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293S GnTI $^{-}$ TetR τα οποία διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pACMV tetO.

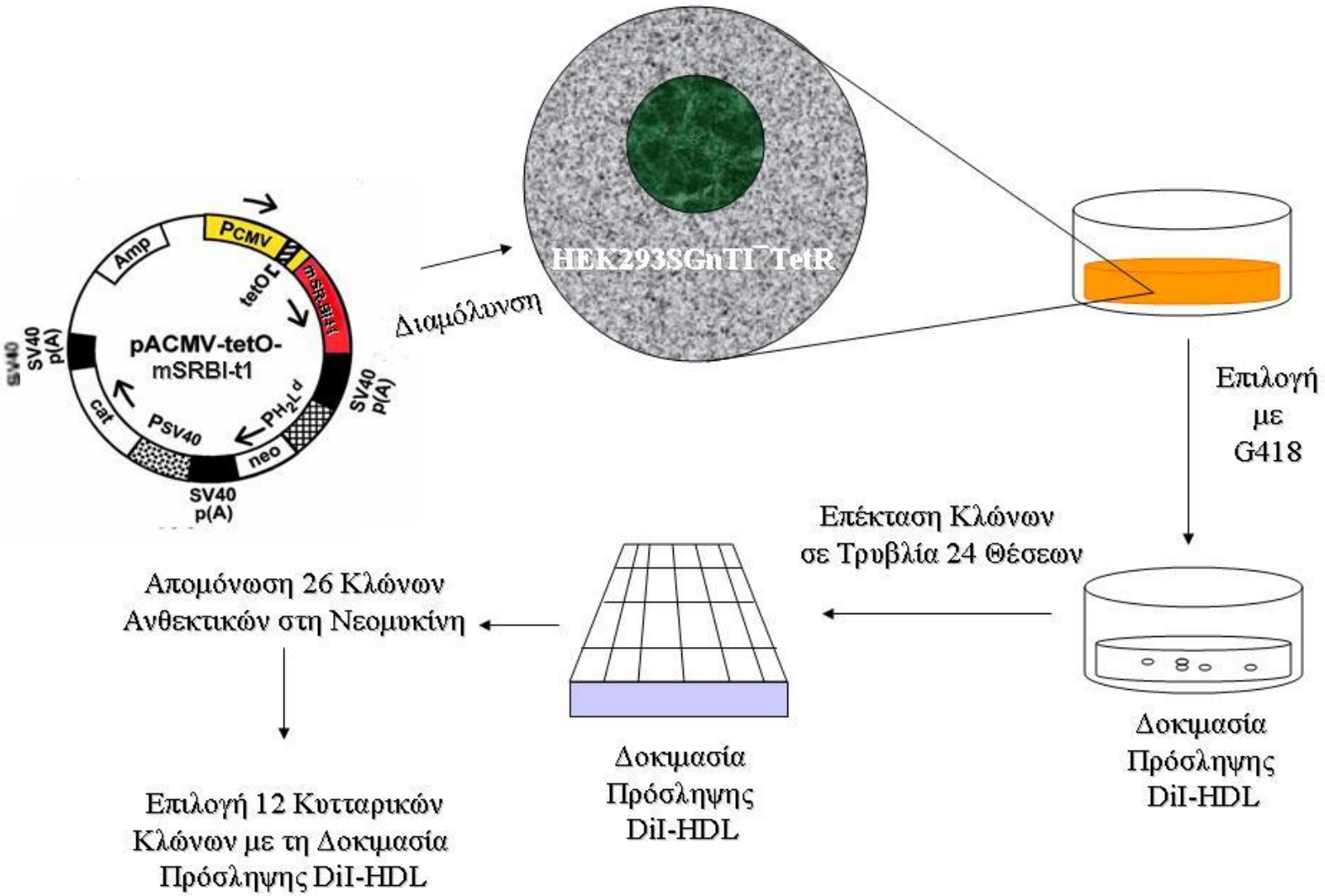
Μετά από δύο εβδομάδες εμφανίστηκαν μεμονωμένες αποικίες, οι οποίες εντοπίστηκαν και σημειώθηκαν με εξέταση των τρυβλίων με οπτικό μικροσκόπιο και στη συνέχεια προσελήφθησαν υπό άσηπτες συνθήκες σε απαγωγό τύπου Sterilgard με πιπέτα 200 μl και μεταφέρθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων.

Όπως φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 7, επελέγησαν κατ'αρχάς 26 μεμονωμένες αποικίες, οι οποίες ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν τη φθορίζουσα ένωση DiI (βλέπε πιο πάνω) μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη και βουτυρικό νάτριο. Εν συνεχεία έγινε επιλογή 12 από τις 26 αποικίες που έχουν τη μεγαλύτερη ικανότητα πρόσληψης της ένωσης DiI-HDL, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8. Οι κλώνοι αυτοί επεκτάθηκαν από τρυβλία 24 θέσεων σε τρυβλία 12 θέσεων, 6 θέσεων και τελικά σε τρυβλία 10 cm.

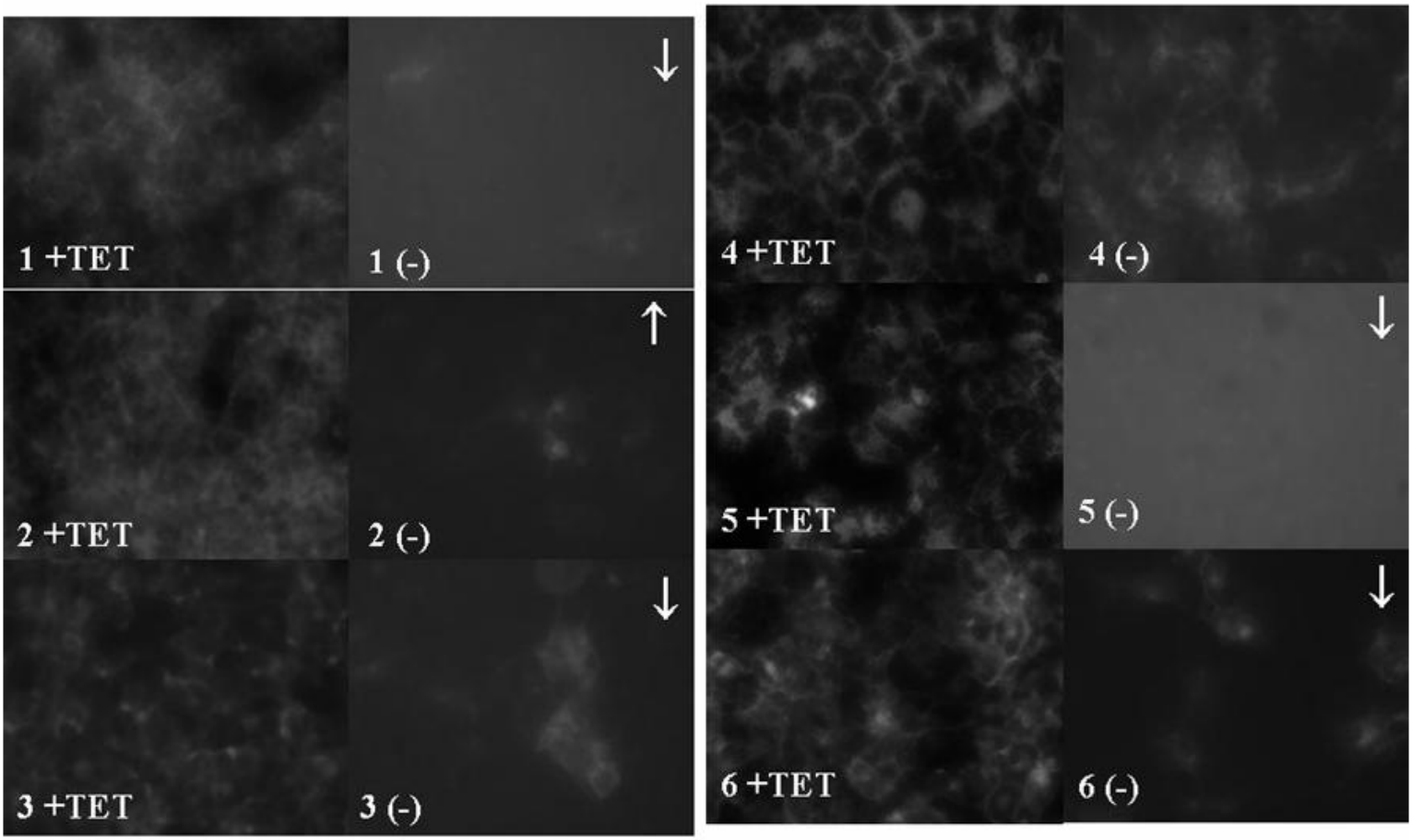
Δ. Προσδιορισμός του Κυτταρικού Κλώνου HEK293SGnTI-TetR που Εκφράζει τον mSR-BI-t1 σε Μεγαλύτερο Βαθμό με Ανάλυση Western

Στο στάδιο των τρυβλίων 6 θέσεων, οι κλώνοι HEK293SGnTI$^{(-)}$TetR[mSR-BI-t1] ελέγχθηκαν για τα επίπεδα έκφρασης της mSR-BI-t1 με ανάλυση Western, με και χωρίς

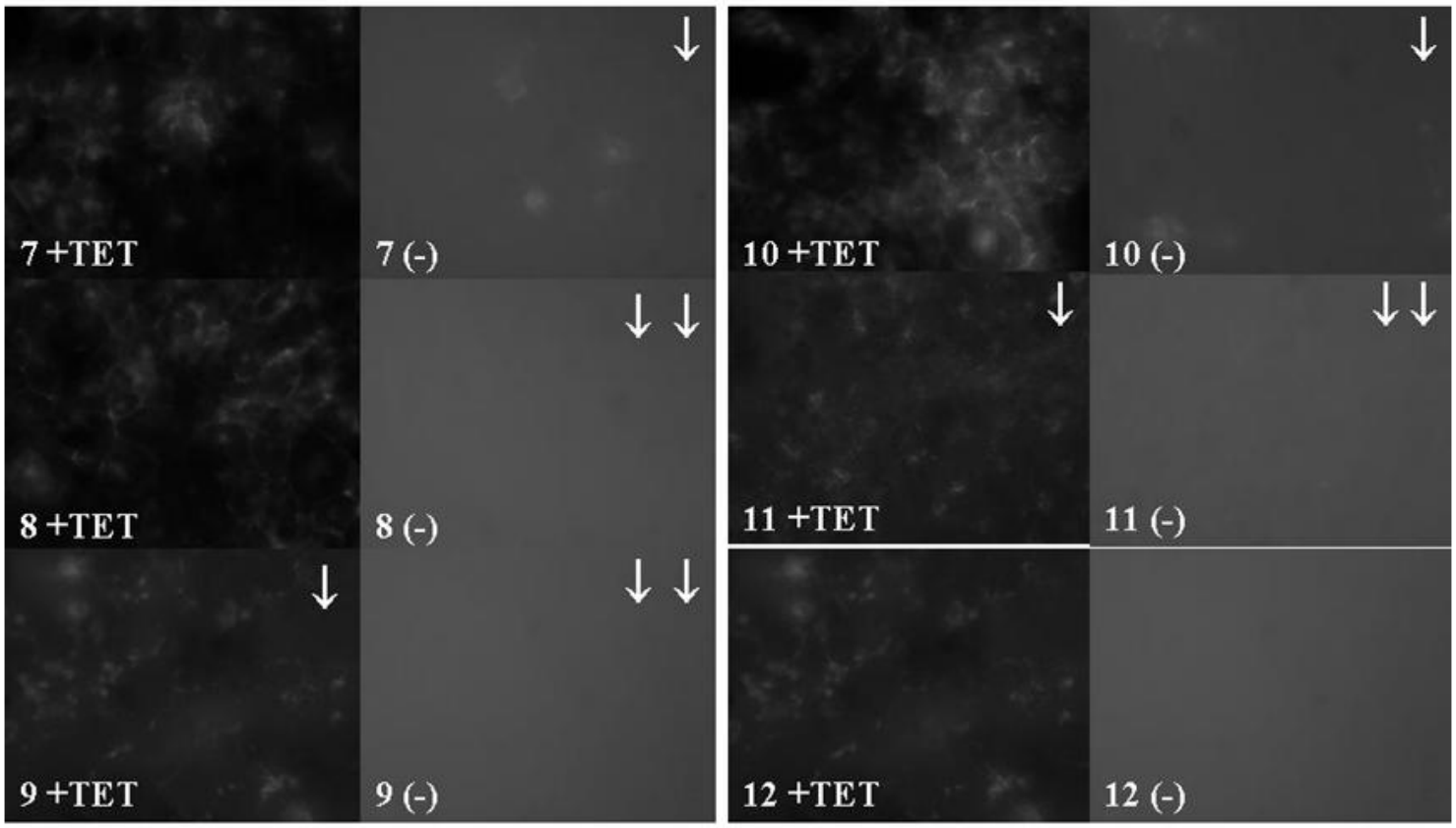
προσθήκη τετρακυκλίνης και βουτυρικού νατρίου. Ο mSR-BI-t1 ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα KKB1, το οποίο αναγνωρίζει την καρβοξυ-τελική του περιοχή (Εικ. 9). Ως θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα της κυτταρικής σειράς HEK293S[mSR-BI-



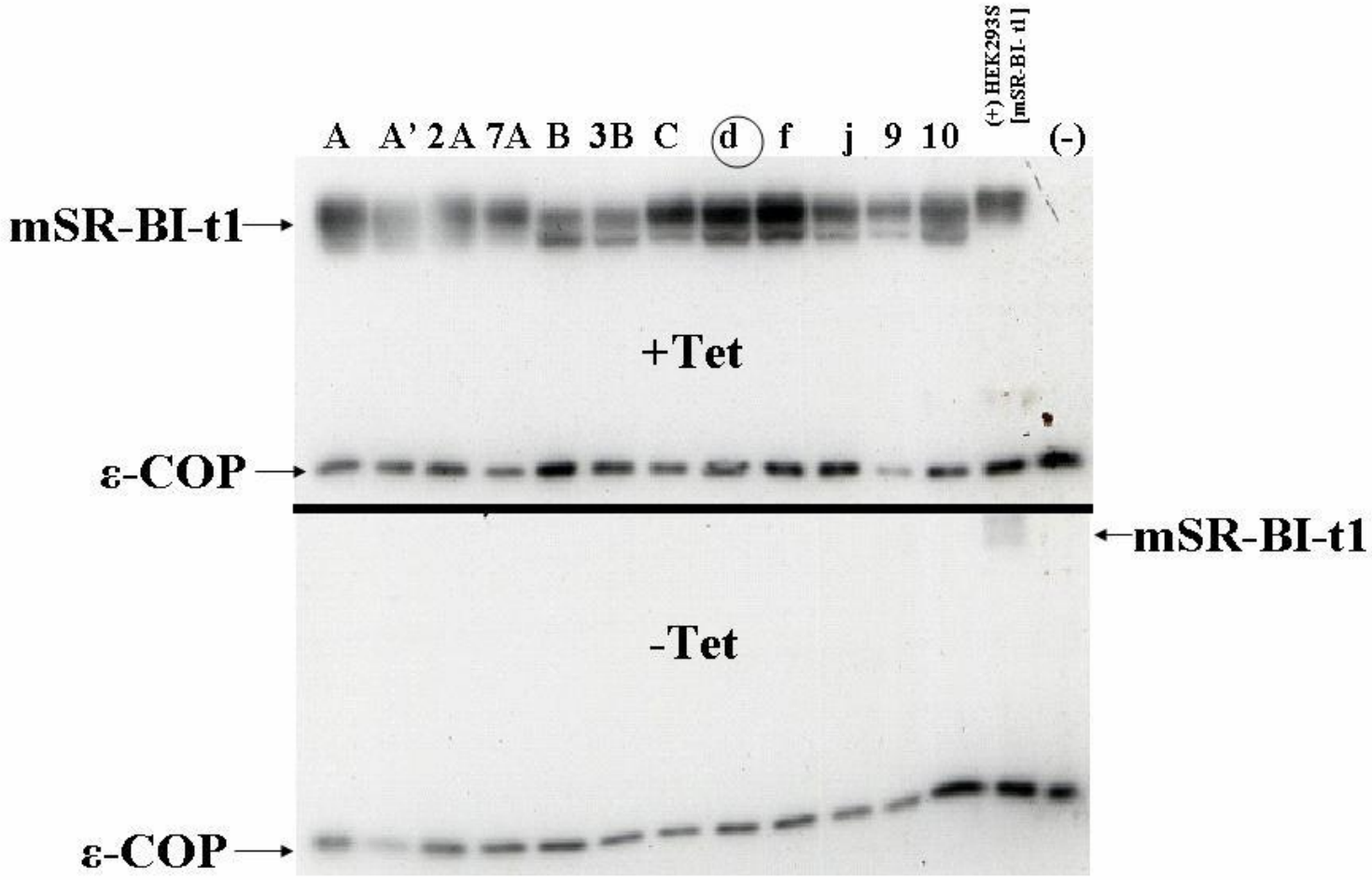
Εικ. 7. Σταθερή Διαμόλυνση Κυτταρικής Σειράς HEK293SGnTI(-)TetR[mSR-BI-t1] με το Πλασμίδιο pACMV-tetO-mSR-BI-t1



Εικ. 8[A]. Επιλογή Σταθερών Κυτταρικών Κλώνων HEK293SGnTI-TetR[mSR-BI-t1] Ανθεκτικών στη Νεομυκίνη με τη Δοκιμασία Πρόσληψης DiI – Αναζητήθηκαν Κλώνοι με Υψηλό Επίπεδο Έκφρασης του mSR-BI-t1 (↑) τη Παρουσία Τετρακυκλίνης (+TET) και Χαμηλό (↓) τη Απουσία Αυτής (-)



Εικ. 8Β. Επιλογή Σταθερών Κυτταρικών Κλώνων HEK293SGnTI-TetR[mSR-BI-t1] Ανθεκτικών στη Νεομυκίνη με τη Δοκιμασία Πρόσληψης DiI – Αναζητήθηκαν Κλώνοι με Υψηλό Επίπεδο Έκφρασης του mSR-BI-t1 (↑) τη Παρουσία Τετρακυκλίνης (+TET) και Χαμηλό (↓) τη Απουσία Αυτής (-)



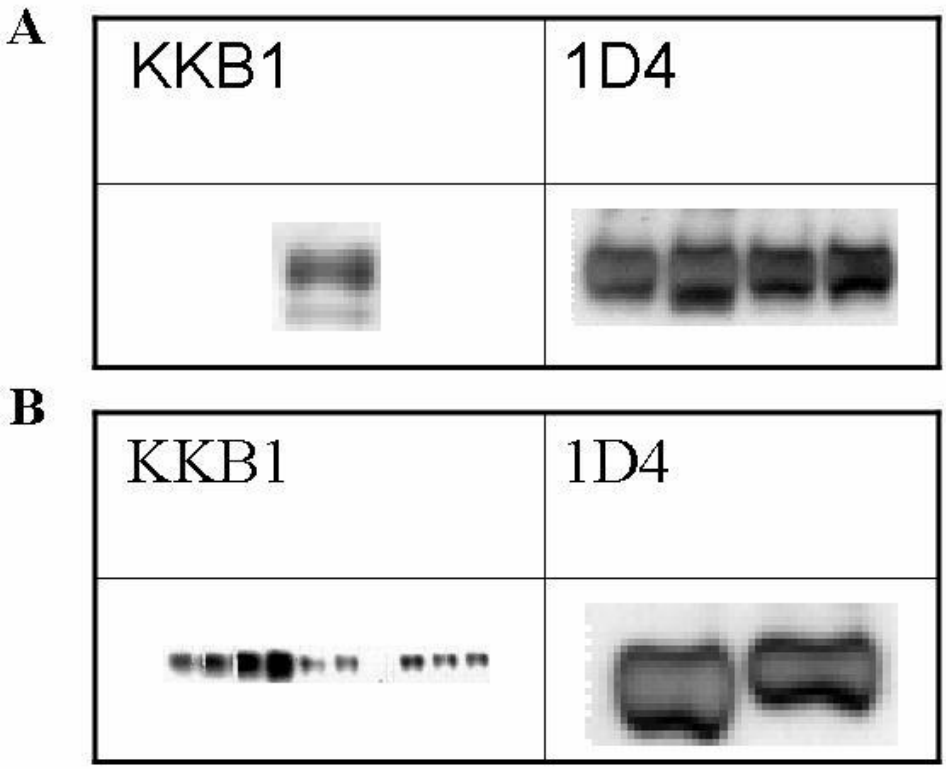
Εικ. 9. Ανάλυση Western για τον Προσδιορισμό των Επιπέδων Έκφρασης του mSR-BI-t1 Με (+Tet) και Χωρίς (-Tet) Προσθήκη Τετρακυκλίνης . Οι Κλώνοι d & f Φαίνεται να Είναι οι Καλύτεροι Εκφραστές.

t1] που εκφράζει σταθερά την αγρίου τύπου μορφή του mSR-BI-t1 και ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από κύτταρα HEK293S. Για τη σύγκριση της ποσότητας των πρωτεϊνικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα ε-COP, το οποίο αναγνωρίζει την υπομονάδα ε του πρωτεϊνικού συμπλέγματος του κυτταροσκελετού coatomer protein complex (Εικ.9).

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν ότι ο mSR-BI-t1 εκφράζεται σε επίπεδα υψηλά μετά από προσθήκη τετρακυκλίνης και βουτυρικού νατρίου και μη ανιχνεύσιμα, τη απουσία αυτών. Επίσης, έδειξαν ότι ο mSR-BI-t1 εμφανίζει δύο ζώνες παρόμοιου μεγέθους, οι οποίες αντιστοιχούν σε υποδοχέα με και χωρίς τον πεπτιδικό επίτοπο t1. Αυτό δείχθηκε με παρόμοια ανάλυση κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοανίχνευση του mSR-BI-t1, το μονοκλωνικό αντίσωμα 1D4, το οποίο αναγνωρίζει τον t1 (Εικ.10). Τέλος, η ανάλυση αυτή επέτρεψε την επιλογή των καλύτερων κλώνων, βάσει των επιπέδων έκφρασης του mSR-BI-t1. Έτσι επελέγη ένας από αυτούς τους κλώνους (“d”, Εικ. 9), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για όλες τις περαιτέρω αναλύσεις και δοκιμασίες και επεκτάθηκε σε τρυβλίο διαμέτρου 150 mm.

2. Μικρής Κλίμακας Καθαρισμός της Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας

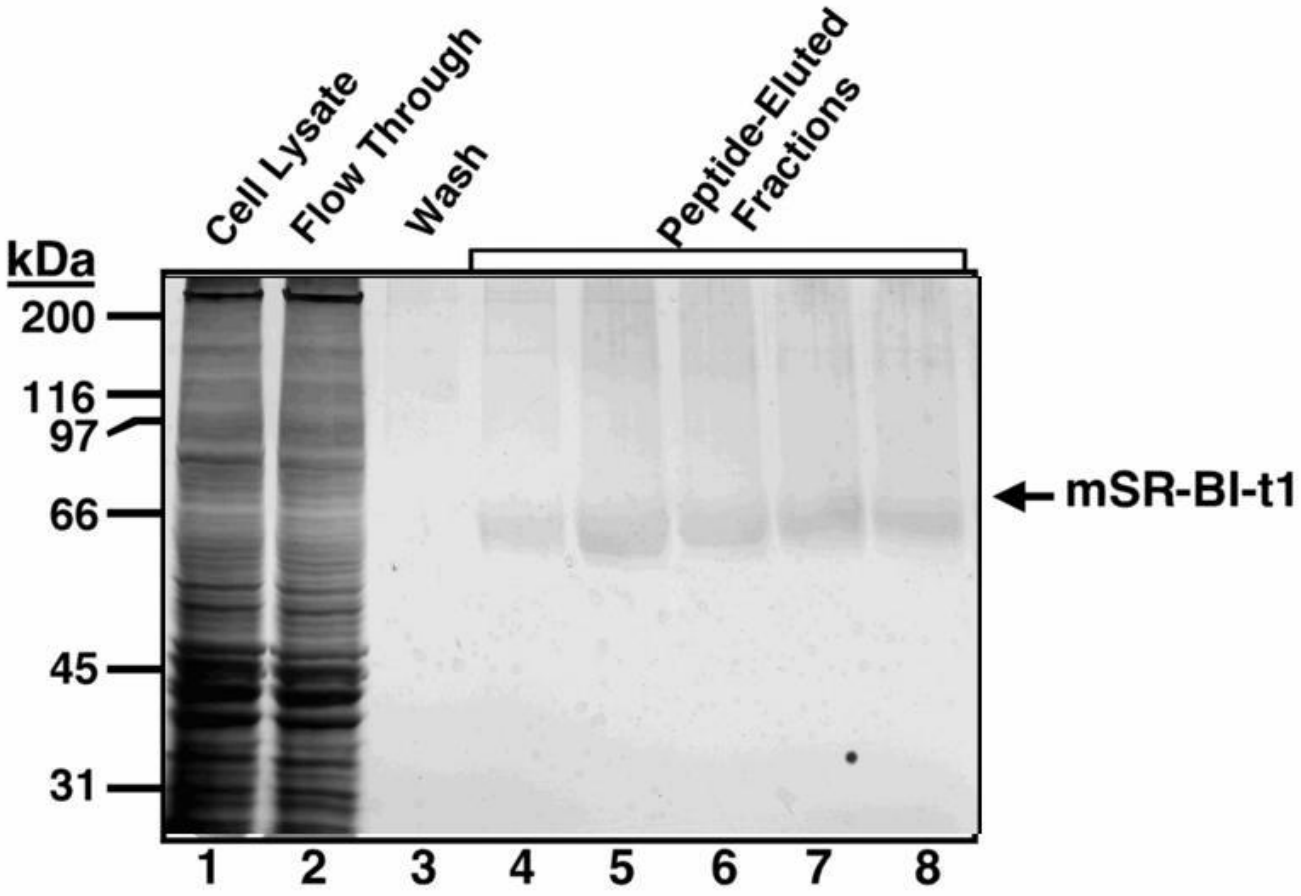
Από την κυτταρική πελέτα HEK293SGnTI⁻TetR[mSR-BI-t1] που συνελέγη από ένα τρυβλίο διαμέτρου 150 mm μετά από επαγωγή της έκφρασης του mSR-BI-t1 με τετρακυκλίνη και βουτυρικό νάτριο, ακολούθησε καθαρισμός του υποδοχέα με χρήση στήλης ανοσοσυγγενείας (σεφαρόζης-1D4). Εν συντομία, 0.1 gr (υγρού βάρους) της



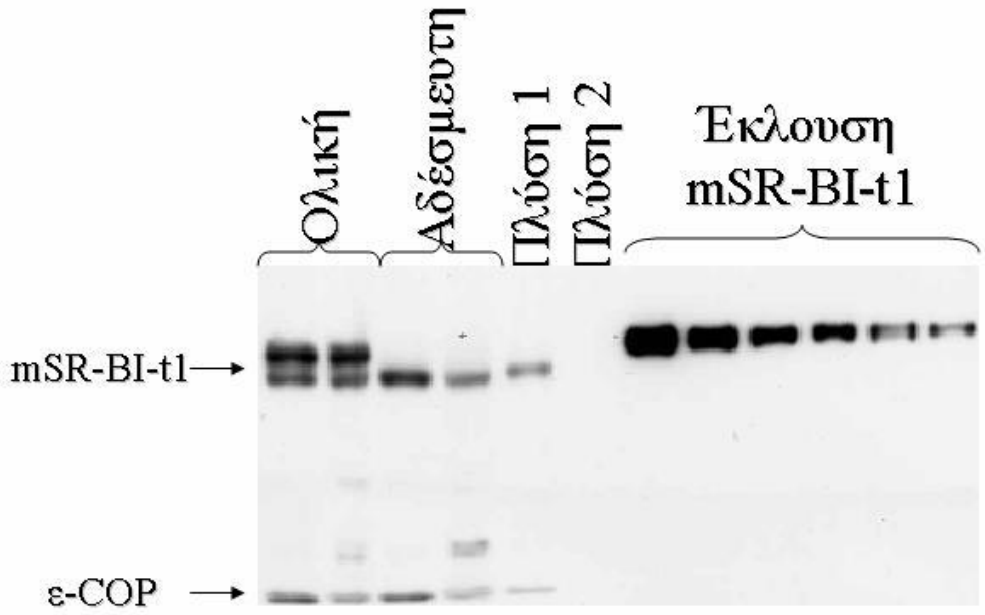
Εικ.10. Ανάλυση Western για την Ταυτοποίηση των Δύο Ανοσοανιχνευόμενων Μορφών του mSR-BI-t1. Σε Κυτταρικό Εκχύλισμα HEK293SGnTI-TetR[mSR-BI-t1] ο Υποδοχέας Ανιχνεύεται ως Διπλή Ζώνη με το Αντίσωμα KKB1 και Ως Μονήρης Ζώνη με το Αντίσωμα 1D4 (A). Αντιθέτως Μετά την Απομόνωσή του με Σφαιρίδια 1D4-Σεφαρόζης Ανιχνεύεται Ως Μονήρης Ζώνη και από τα Δύο Αντισώματα (B).

πελέτας επωάστηκαν με 1ml διαλύματος Α [1.5% (βάρος/όγκος) octyl glucoside και αναστολείς πρωτεασών Complete (1X) σε 1X PBS] για 1 ώρα. Το εκχύλισμα επωάστηκε με σφαιρίδια 1D4-σεφαρόζης για 2 ώρες. Το 1D4 είναι το αντίσωμα που αναγνωρίζει τον καρβοξυ-τελικό επίτοπο t1 του mSR-BI-t1. Στη συνέχεια το μίγμα αυτό μεταφέρθηκε σε φίλτρα φυγοκέντρησης [Ultrafree-MC spinner filters (MILLIPORE, #UFC30DV25)], όπου φυγοκεντρήθηκε για ~1min στις 4000 στροφές σε επιτραπέζια φυγόκεντρο. Ύστερα, τα σφαιρίδια 1D4-σεφαρόζης πλύθηκαν στα φίλτρα με διάλυμα Α και διάλυμα στήλης [10mM Tris (pH 6.0), 1.5% octyl glucoside και αναστολείς πρωτεασών Complete 1X] με φυγοκέντρηση. Τελικά τα σφαιρίδια επωάστηκαν με διάλυμα έκλουσης (διάλυμα στήλης το οποίο περιλαμβάνει 100 μM εννεαπεπτιδίου t1) και ο mSR-BI-t1 εκλούστηκε με φυγοκέντρηση. Ο υποδοχέας διατηρήθηκε στο διάλυμα έκλουσης στους -20 ^{o}C.

Τα αποτελέσματα ενός τυπικού καθαρισμού μικρής κλίμακας με την περιγραφείσα τεχνική φαίνονται στην Εικ.11 , στην οποία τα δείγματα που παραλήφθηκαν κατά τη διάρκεια του καθαρισμού, αναλύθηκαν με 8% SDS-PAGE και παρατηρήθηκαν με χρώση της γέλης με διάλυμα αργύρου. Τόσο το αρχικό κυτταρικό εκχύλισμα (*στήλη 1*), όσο και το διάλυμα πλύσης (που προέκυψε από φυγοκέντρηση, μετά από επώαση του εκχυλίσματος με τα σφαιρίδια σεφαρόζης-1D4 και επομένως δεν κατακρατήθηκε από τη στήλη) (*στήλη 2*), περιείχαν πολλές πρωτεΐνες. Μετά από δέκα πλύσεις της στήλης δεν ήταν ανιχνεύσιμη καμμιά πρωτεΐνη (*στήλη 3*). Τέλος, το υλικό που εκλούστηκε από τη στήλη με διάλυμα που περιείχε το εννεαπεπτίδιο ήταν καθαρή mSR-BI-t1 πρωτεΐνη (*στήλες 4-8*). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του mSR-BI-t1 αντιστοιχεί στα 82 kDa, όπως αναμένεται από προηγούμενες μελέτες (13). Ανάλυση Western μιας παρόμοιας γέλης με το αντίσωμα KKB-1, το οποίο αναγνωρίζει τον SR-BI, έδειξε ότι η μείζων πρωτεϊνική ζώνη που ανιχνεύεται με τη χρώση αργύρου είναι πράγματι ο mSR-BI-t1 (Εικ.12). Η ίδια ανάλυση έδειξε επίσης ότι κάποια ποσότητα του mSR-BI (που αντιστοιχεί κατά πάσα πιθανότητα στη μορφή του χωρίς τον πεπτιδικό επίτοπο) ήταν παρούσα στο κυτταρικό εκχύλισμα και εμφανίστηκε στο διάλυμα που πέρασε από τη στήλη, καθώς και τα κλάσματα που συνελέγησαν κατά τις πλύσεις.



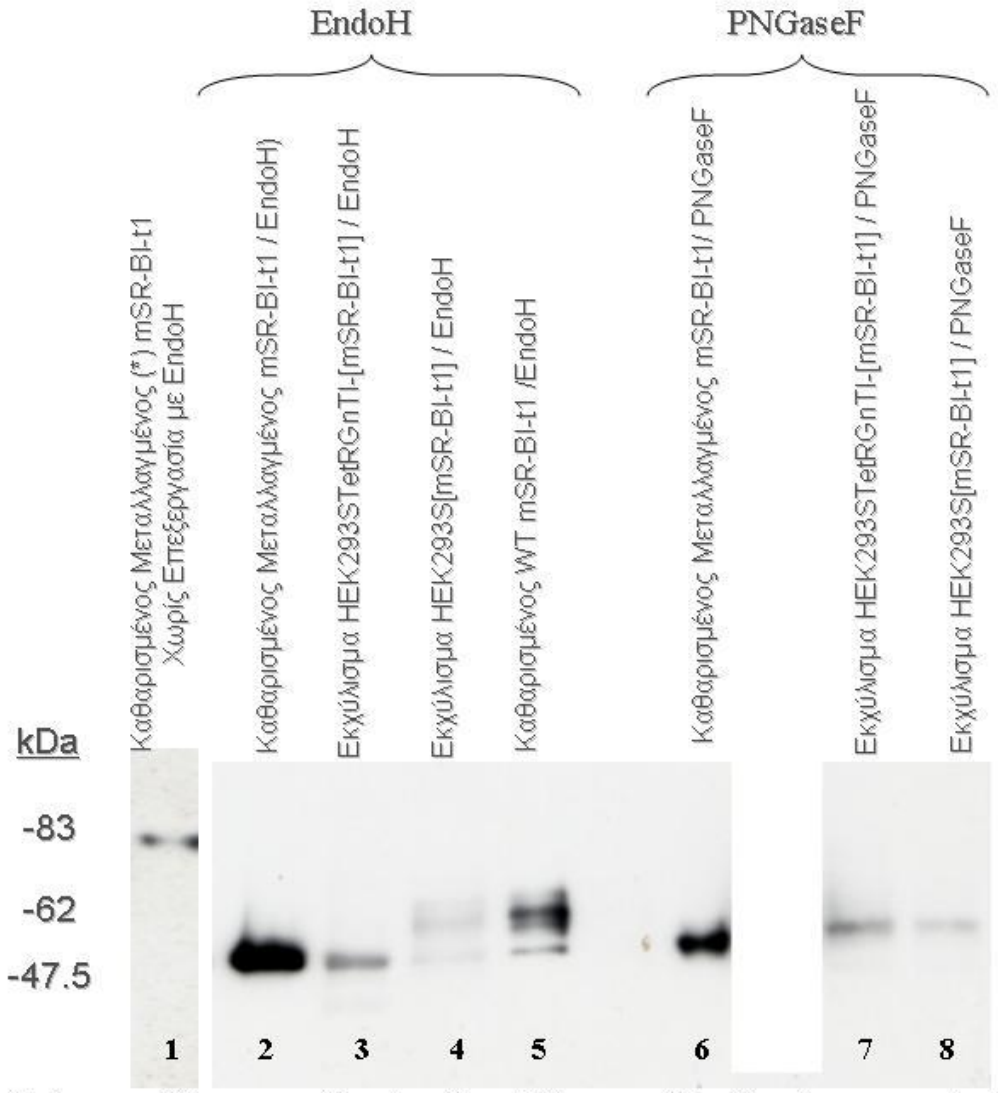
Εικ. 11. Μικρής Κλίμακας Καθαρισμός του mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας



Εικ. 12. Ανοσοανίχνευση του mSR-BI-t1 σε Κλάσματα που Συνελέγησαν Κατά τον Καθαρισμό του σε Μικρή Κλίμακα με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας

3. Εκτίμηση των Χαρακτηριστικών Γλυκοζυλίωσης της Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 Μέσω Πέψης με Ενδογλυκοζιδάση Η (EndoH) και N-Γλυκανάση (PNGase F).

Προκειμένου να ελεγχθούν οι ιδιότητες γλυκοζυλίωσης της μεταλλαγμένης μορφής του mSR-BI-t1, σε σύγκριση με τον αγρίου τύπου mSR-BI-t1, έγινε πέψη και των δύο μορφών του υποδοχέα, απομονωμένου και σε κυτταρικό εκχύλισμα, με ενδογλυκοζιδάση Η (endoglycosidase H, EndoH) και N-γλυκανάση (N-glycanase, PNGase F) (Εικ. 13). Το ένζυμο EndoH πέπτει μόνο υψηλής μανόζης και υβριδικού τύπου N-γλυκάνες (βλέπε «Εισαγωγή»). Οι υψηλής μανόζης N-ολιγοσακχαρίτες προστίθενται στον νεο-συντεθειμένο mSR-BI-t1 στο ενδοπλασματιό δίκτυο, πριν από την επεξεργασία του στο σύμπλεγμα Golgi. Μετά την επεξεργασία της πρωτεΐνης στο Golgi, ο mSR-BI-t1 περιλαμβάνει τις εξής δύο τάξεις N-ολιγοσακχαριτών σε σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα CHO και COS, σε καλλιέργεια ή σε επινεφρίδια in vivo: α) ολιγοσακχαρίτες ανθεκτικούς στην πέψη με EndoH (συμπλόκου τύπου N-γλυκάνες) και β) ολιγοσακχαρίτες ευαίσθητους στην πέψη από EndoH (είτε υψηλής μανόζης ή υβριδικού τύπου N-γλυκάνες) (14, 15). Ο βαθμός της επεξεργασίας των γλυκανών (που αντιστοιχεί στο βαθμό ανθεκτικότητας του υποδοχέα στην πέψη από EndoH), ποικίλλει αναλόγως του κυτταρικού τύπου/ιστού (15). Όπως παρατηρήθηκε στο παρελθόν σε κύτταρα CHO, η πέψη του αγρίου τύπου υποδοχέα με EndoH παράγει δύο ζώνες κατά την ανάλυση Western (Εικ. 13, στήλη 4&5). Η κατώτερη ζώνη αντιστοιχεί στη μορφή εκείνη που είναι πλήρως ευαίσθητη στη δράση του EndoH και που πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει την πρόδρομο μορφή της πρωτεΐνης, πριν από την επεξεργασία στο σύμπλεγμα Golgi (15, 208, 209). Η ανώτερη ζώνη αντιπροσωπεύει την επεξεργασμένη μορφή, που είναι μερικώς ανθεκτική στη δράση του EndoH. Αντιθέτως, η πέψη της μορφής του υποδοχέα που παρήχθη σε κύτταρα HEK293SGnTI$^{(-)}$TetR και έχει περιορισμένη και ομοιογενή N-γλυκοζυλίωση, με EndoH (Εικ. 13, ζώνη 2) και σε εκχύλισμα κυττάρων HEK (Εικ. 13, ζώνη 3), παρήγαγε μία μοναδική ζώνη κατά την ανάλυση Western. Όπως ανεφέρθη, η κυτταρική σειρά HEK293SGnTI$^{(-)}$TetR είναι αρνητική για τη δράση του ενζύμου GnTI (βλέπε «Εισαγωγή») και μπορεί να προσθέσει μόνο $(GlcNAc)_2Man5$ ολιγοσακχαρίτες στον SR-BI. Από την άλλη πλευρά, η PNGaseF πέπτει όλες τις N-γλυκάνες, υψηλής μανόζης και τις υβριδικές (μορφές με τροποποίηση ενδιάμεση μεταξύ υψηλής μανόζης



Εικ. 13. Εκτίμηση και Σύγκριση των Ιδιοτήτων Γλυκοζυλίωσης του Μεταλλαγμένου και του Αγρίου Τύπου mSR-BI-t1, Απομονωμένου και σε Κυτταρικό Εκχύλισμα, μέσω Πέψης με EndoH και PNGaseF – ο Όρος Μεταλλαγμένος Αναφέρεται Στον SR-BI που Περιέχει Μόνο (GlcNAc)2Man5 Σάκχαρα (*)

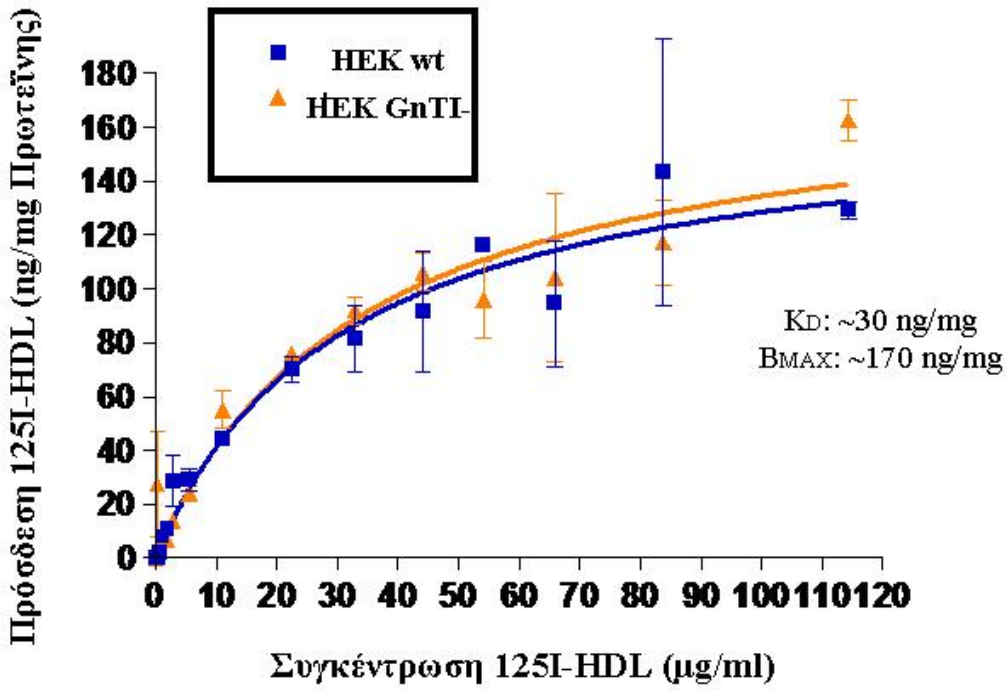
και συμπλόκων ολιγοσακχαριτών) και επομένως παράγει μία μοναδική ζώνη μετά από πέψη, τόσο του αγρίου τύπου (Εικ. 13, ζώνη 8), όσο και του μεταλλαγμένου υποδοχέα (Εικ. 13, ζώνη 6&7).

Ένα ακόμη συμπέρασμα που προκύπτει από αυτή την ανάλυση είναι ότι, όπως δείχθηκε και σε κύτταρα CHO και COS (14, 15), οι περισσότεροι από τους N-ολιγοσακχαρίτες του αγρίου τύπου SR-BI, όταν αυτός εκφράζεται σταθερά σε κύτταρα HEK, είναι ευαίσθητοι στη δράση του Endo H μετά την επεξεργασία τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της επεξεργασμένης, μερικώς ευαίσθητης μορφής του υποδοχέα ήταν ελάχιστα μικρότερη από αυτήν της πλήρως ευαίσθητης μορφής και σημαντικά μεγαλύτερη από αυτήν της πρωτεΐνης που δεν υπεβλήθη σε πέψη με EndoH . Μετά την επεξεργασία με EndoH, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της μορφής του SR-BI που υπέστη πλήρη γλυκοζυλίωση στο σύστημα Golgi είναι ελάχιστα μικρότερη από τη μορφή που υπέστη μερική γλυκοζυλίωση στο σύστημα Golgi (Εικ. 13, στήλες 1,4,5).

4. Σύγκριση των Ιδιοτήτων Πρόσδεσης του Αγρίου Τύπου και Μεταλλαγμένου mSR-BI-t1 με Πραγματοποίηση Κυτταρικής Δοκιμασίας Πρόσδεσης Κορεσμού της ^{125}I-HDL

Προκειμένου να συγκριθούν οι ιδιότητες πρόσδεσης της αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης μορφής του mSR-BI-t1, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία πρόσδεσης κορεσμού της ^{125}I-HDL από κύτταρα HEK τα οποία εκφράζουν τη μία ή την άλλη μορφή του υποδοχέα. Αυτό επετεύχθη με παροδική διαμόλυνση, με το πλασμίδιο έκφρασης pmSR-BI-t1, αγρίου τύπου κυττάρων HEK (τα οποία εκφράζουν την αγρίου τύπου μορφή του υποδοχέα) και μεταλλαμένων κυττάρων HEK293SGnTI$^{(-)}$ στα οποία έχει απαλειφθεί η ενεργότητα του γονιδίου της N-ακετυλ γλυκοζαμινυλ-τρανσφεράσης I, και τα οποία, συνεπώς, παράγουν υποδοχέα με ομοιογενή και περιορισμένη γλυκοζυλίωση (βλέπε «Εισαγωγή»). Στη συνέχεια τα διαμολυσμένα κύτταρα επωάστηκαν για δύο ώρες στους 37°C με διαφορετικές συγκεντρώσεις ^{125}I-HDL, τη παρουσία ή απουσία περίσσειας (40X) μη σημασμένης HDL. Η μη-σημασμένη HDL ανταγωνίζεται τη σημασμένη για την πρόσδεση στον mSR-BI-t1 και επομένως επιτρέπει τη μέτρηση της

μη-ειδικής πρόσδεσης της ^{125}I-HDL. Η πρόσδεση της ^{125}I-HDL στα κύτταρα γίνεται με μέτρηση της ακτινοβολίας μετά από επώαση των κυττάρων με ^{125}I-HDL και πλύση. Οι τιμές της ειδικής πρόσδεσης της ^{125}I-HDL στον mSR-BI-t1 ορίζονται ως η διαφορά ανάμεσα στην ολική πρόσδεση και την πρόσδεση που μετράται παρουσία της μη-σημασμένης HDL. Εν συνεχεία, με τη χρήση του προγράμματος PRISM (GraphPad Software Inc.), υπελογίσθη η καμπύλη πρόσδεσης της ^{125}I-HDL (Εικ. 14) και



Εικ. 14. Καμπύλες Πρόσδεσης Κορεσμού της 125I-HDL σε Κυτταρικές Σειρές HEK που Εκφράζουν την Αγρίου Τύπου (HEK wt) και Μεταλλαγμένη Μορφή (HEKGnTI-) του mSR-BI-t1

για τους δύο τύπους υποδοχέα. Φάνηκε έτσι ότι οι δύο μορφές του mSR-BI-t1 έχουν παρόμοιες ιδιότητες πρόσδεσης (Kd: ~30 ng/mg, Bmax: ~170 ng/mg). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν μια ακόμη ένδειξη ότι η μεταλλαγμένη μορφή του υποδοχέα είναι λειτουργική και ότι προσφέρεται για περαιτέρω μελέτες.

5. Μεγάλης Κλίμακας Καλλιέργεια Κυτταρικής Σειράς HEK293S GnTI$^{(-)}$ TetR [mSR-BI-t1] σε Βιοαντιδραστήρα Celligen Plus

Μετά τη διαπίστωση ότι ο mSRBI-t1 έχει τις αναμενόμενες ιδιότητες γλυκοζυλίωσης και ότι μπορεί να απομονωθεί σε μικρή κλίμακα και σε καθαρή μορφή, με την τεχνική της χρωματογραφίας ανοσοσυγγενείας, ακολούθησε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια 5.5L σε βιοαντιδραστήρα Celligen Plus (New Brunswick Scientific), ο οποίος επιτρέπει τη διατήρηση ιδανικών συνθηκών pH και διαλυμένου O_2 στην καλλιέργεια, μέσω της συνεχούς και δυναμικής ρύθμισης των επιπέδων τεσσάρων αερίων (O_2, CO_2, N_2, αέρας). Ως μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium) ελεύθερο ασβεστίου (το ασβέστιο τείνει να οδηγεί σε συσσωμάτωση των κυττάρων) και υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4.5 gr/Lit), το οποίο παρασκευάστηκε από την εταιρεία Atlanta Biologicals. Το μέσο αυτό συμπληρώθηκε με διττανθρακικό νάτριο (3.7gr/Lit) και 0.3 gr/Lit Primatone RL-UF (που χρησιμεύει ως πηγή πεπτιδίων βραχείας αλύσου). Ύστερα από διήθηση σε φίλτρο 0.2μm, το μέσο συμπληρώθηκε επιπλέον με τα ακόλουθα αποστειρωμένα υλικά: FBS (Fetal Bovine Serum, 10% όγκος/όγκος), Πενικιλλίνη G (100 μονάδες/ml), Στρεπτομυκίνη (100 μg/ml), γλουταμίνη (292 μg/ml), θειϊκή δεξτράνη (300 μg/ml), και Pluronic F-68 (0.1% βάρος/όγκος).

Οι συνθήκες καλλιέργειας στον αντιδραστήρα ήταν: 37°C, pH 7 και 50% διαλυμένο O_2. Στο θρεπτικό μέσον προστέθηκαν κύτταρα HEK293SGnTI-TetR[mSR-BI-t1] που συνελέγησαν από 50 τρυβλία διαμέτρου 15εκ. Η ταχύτητα του στροφίου του βιοαντδραστήρα ρυθμίστηκε στις 30 περιστροφές/λεπτό. Την πέμπτη ημέρα μετά την εκκίνηση της καλλιέργειας, προστέθηκαν 50ml 20% (βάρος/όγκος) γλυκόζη και 150ml 10% (βάρος/όγκος) Primatone RL-UF και η έκφραση του mSR-BI-t1 επήχθη την έκτη

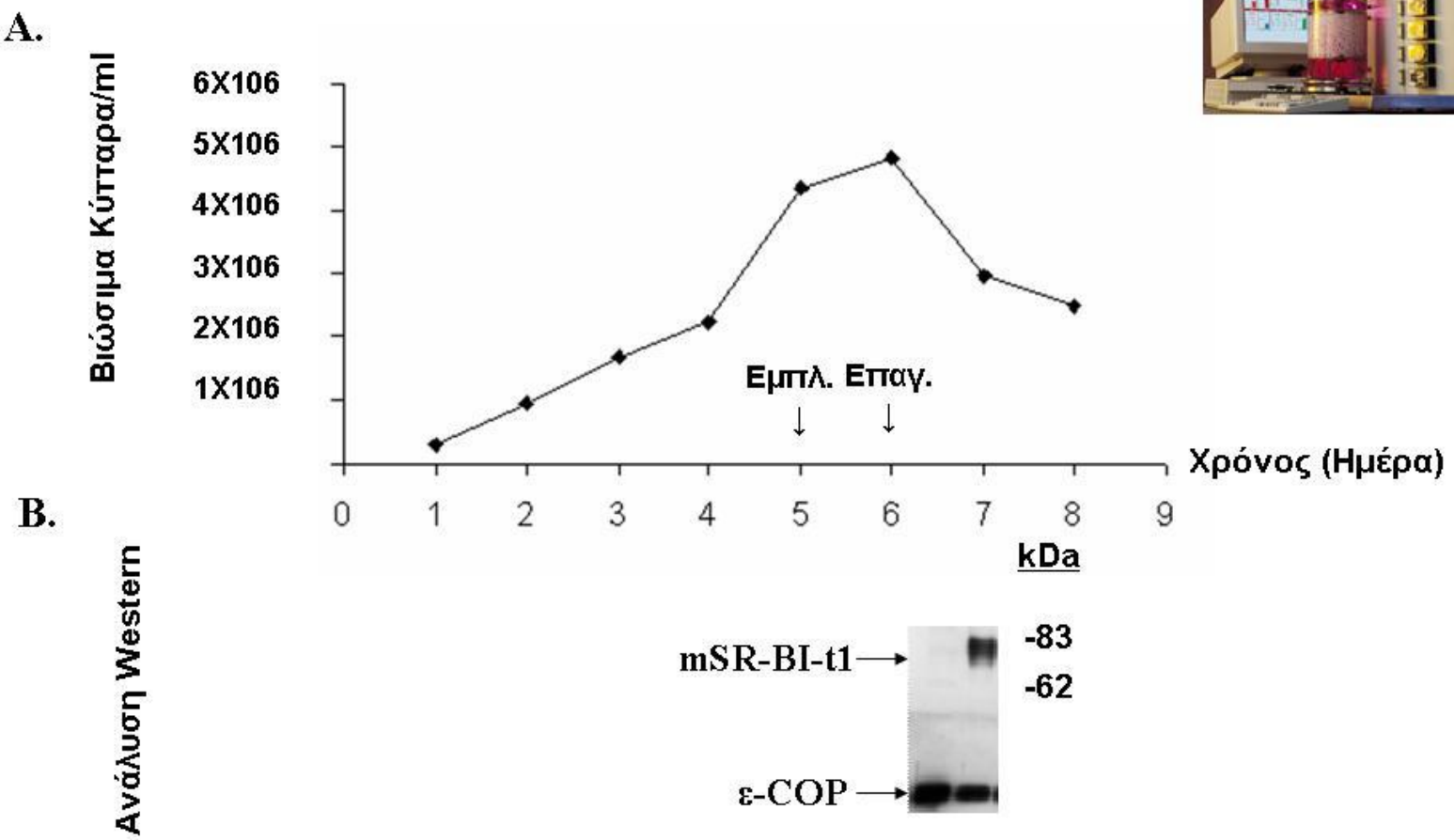
ημέρα με προσθήκη τετρακυκλίνης (2 μg/ml) και βουτυρικού νατρίου (5mM) (Εικ. 15). Τα κύτταρα έφθασαν τη μέγιστη πυκνότητά τους (~5x10^6 κύτταρα/ ml καλλιέργειας) την $6^η$ ημέρα (Εικ. 15). Όπως δείχθηκε με ανάλυση Western σε δείγματα της καλλιέργειας, η έκφραση του mSR-BI-t1 παρατηρείται μόνο μετά από προσθήκη τετρακυκλίνης και βουτυρικού νατρίου (Εικ. 15).

6. Προσδιορισμός της Περιεκτικότητάς σε mSR-BI-t1 της Κυτταρικής Πελέτας από Μεγάλης Κλίμακας Καλλιέργεια Κυτταρικής Σειράς HEK293SGnTI⁻TetR[mSR-BI-t1]

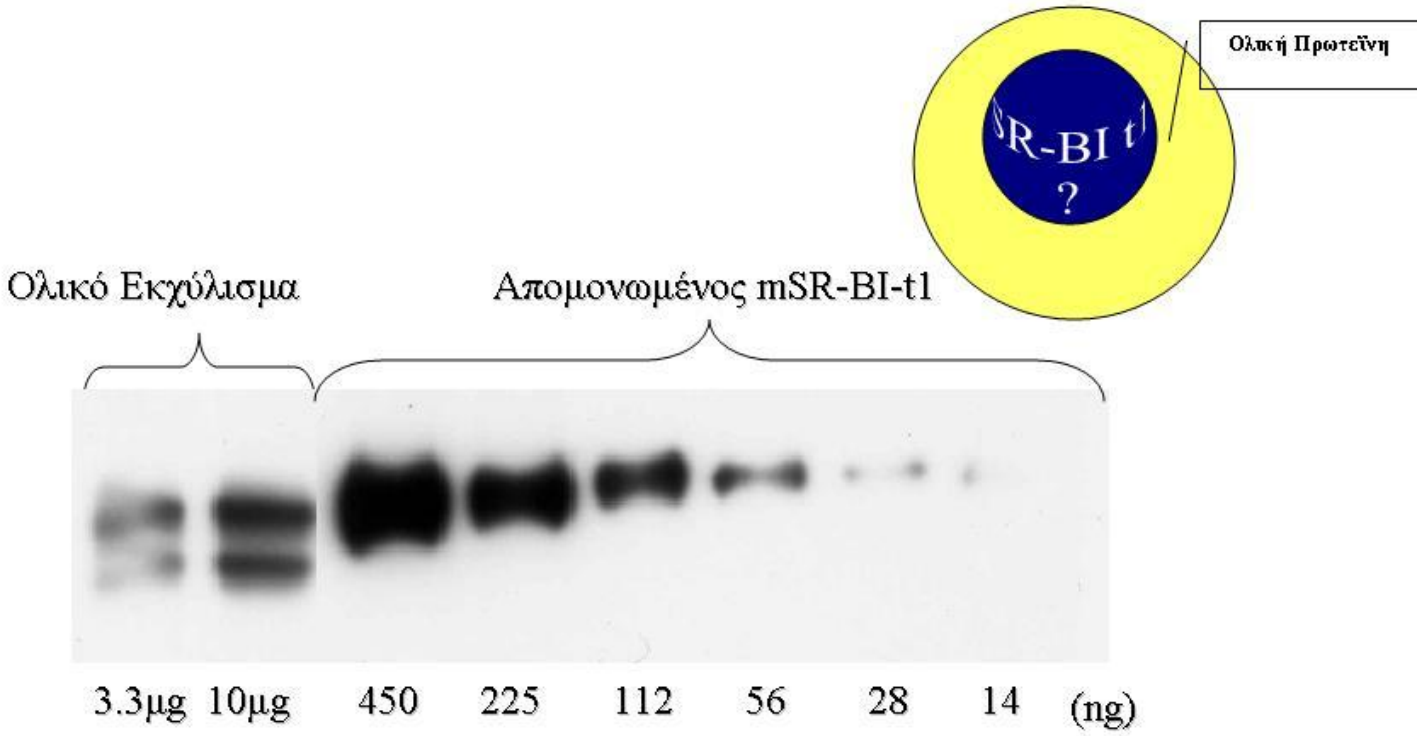
Μετά τον τερματισμό και τη συλλογή της καλλιέργειας 5.5L της κυτταρικής σειράς HEK293S GnTI$^{(-)}$ TetR [mSR-BI-t1] στο βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της περιεκτικότητάς σε mSR-BI-t1, της κυτταρικής πελέτας που προέκυψε από την καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα. Για το σκοπό αυτό έγινε ανάλυση Western κατά την οποία συνεκρίθη η ένταση του σήματος της mSR-BI-t1 σε 3.3 και 10μg ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος μικρού μέρους (ψήγματος) της πελέτας, με τις εντάσεις των σημάτων διαδοχικών αραιώσεων γνωστής ποσότητας καθαρού mSR-BI-t1 (Εικ.16). Αυτό επέτρεψε τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε mSR-BI-t1 ολόκληρης της κυτταρικής πελέτας. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, η ποσότητα του SR-BI σε 3.3 μg εκχυλίσματος είναι περίπου ίση με 56 μg. Μ'αυτό τον τρόπο μπορεί να υπολογιστεί ότι στη συνολική πελέτα μιας καλλιέργειας που περιείχε 460 gr πρωτεΐνης, υπάρχουν 8 mg SR-BI. Η γνώση αυτή είναι πολύ σημαντική προκειμένου να εκτιμηθεί ο όγκος των σφαιριδίων σεφαρόζης-1D4 που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατά την επακόλουθη χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας για τον καθαρισμό του mSR-BI-t1 (βλέπε πιο κάτω), καθώς και την απόδοση της εκάστοτε κυτταρικής καλλιέργειας σε mSR-BI-t1.

7. Μεγάλης Κλίμακας Καθαρισμός της Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας

Ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με τη μέθοδο της χρωματογραφίας ανοσοσυγγενείας. Εν συντομία, η κυτταρική πελέτα λύθηκε με διάλυμα Α [1.5% Octyl



Εικ. 15. Κυτταρική Πυκνότητα της Μεγάλης Κλίμακας Καλλιέργειας Εναιώρησης της Κυτταρικής Σειράς HEK293SGnTI-TetR[mSR-BI-t1] (A) - 24 ώρες Μετά την Επαγωγή με Τετρακυκλίνη (Επαγ.) Παρατηρούμε Έκφραση του mSR-BI-t1 σε Ανάλυση Western (B)



Εικ. 16. Εκτίμηση της Ολικής Ποσότητας του mSR-BI-t1 στην Κυτταρική Πελέτα HEK293SGnTI-TetR[mSR-BI-t1] με Ανάλυση Western

Glucoside (βάρος/όγκος), 15mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών Complete 1X σε 1X PBS (Phosphate Buffered Saline)] και το υπερκείμενο του κυτταρικού εκχυλίσματος μετά από φυγοκέντρηση επωάστηκε με σφαιρίδια σεφαρόζης-1D4 για 2 ώρες υπό ανάδευση.

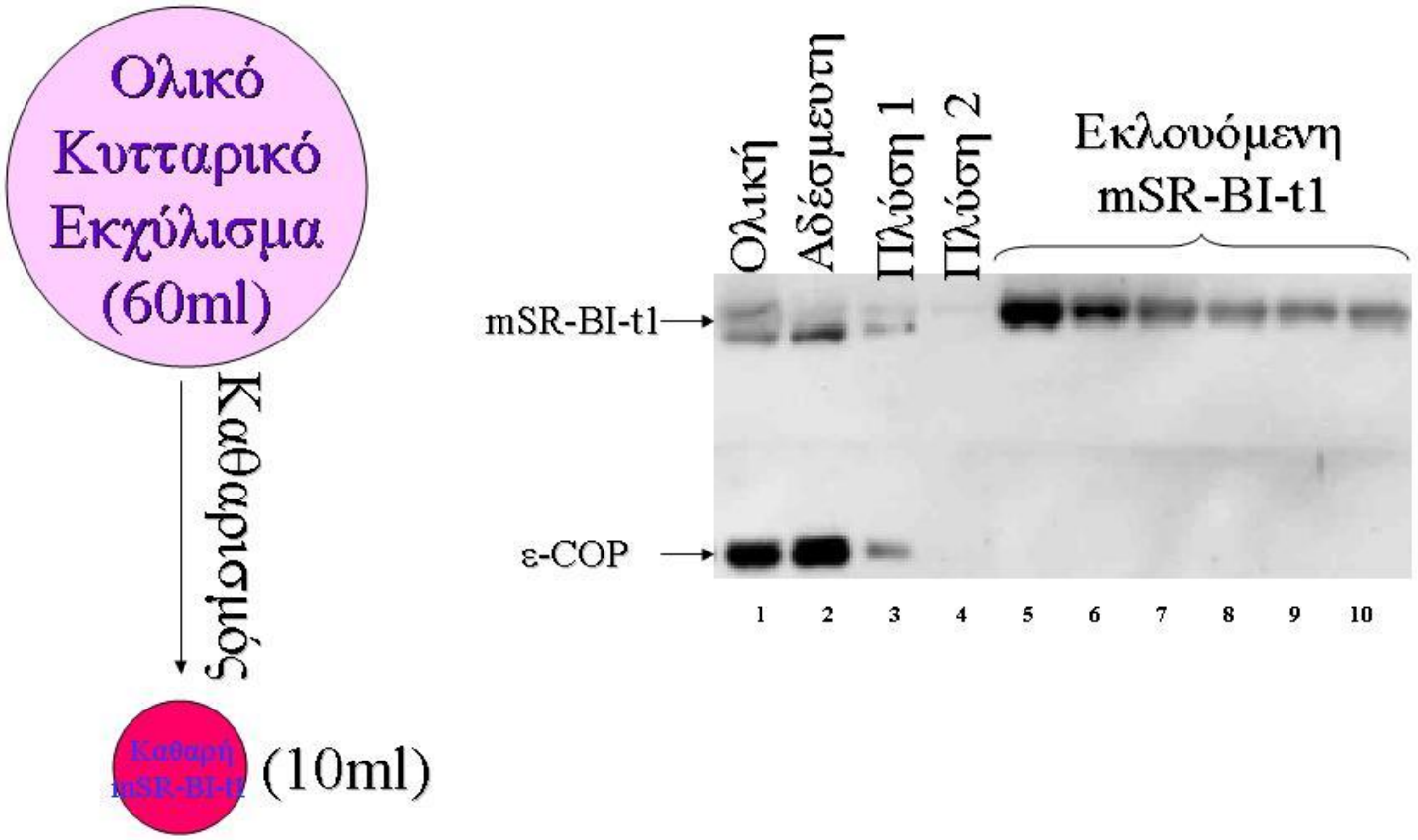
Ο όγκος των σφαιριδίων σεφαρόζης-1D4 που χρησιμοποιήθηκαν προσδιορίστηκε βάσει της εκτιμηθείσας, με τη μέθοδο που περιεγράφη πιο πάνω, περιεκτικότητας της κυτταρικής πελέτας σε mSR-BI-t1, σε συνδυασμό με την ικανότητα πρόσδεσης (binding capacity) των σφαιριδίων. Η τελευταία προσδιορίστηκε με επώαση γνωστής ποσότητας απομονωμένου υποδοχέα με διαφορετικές ποσότητες σφαιριδίων (βλέπε «Υλικά και Μέθοδοι»), και είναι συνήθως 1-2 mg mSR-BI-t1 ανά ml σφαιριδίων.

Η αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης του υποδοχέα στα σφαιρίδια 1D4-σεφαρόζης εκτιμήθηκε με ανάλυση Western (Εικ.17), κατά την οποία έγινε σύγκριση του σήματος του SR-BI σε 10μg ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος πριν (ζώνη 1) και μετά (ζώνη 2) την επώαση με τα σφαιρίδια. Ένα αναμενόμενο συμπέρασμα από αυτή την ανάλυση είναι ότι τα σφαιρίδια προσδένουν μόνο τη μορφή του υποδοχέα η οποία φέρει τον επίτοπο t1, κάτι το οποίο μειώνει την απόδοση του καθαρισμού. Η πρόσδεση της μορφής του SR-BI που περιέχει τον επίτοπο t1 (στήλες 1 & 2), είναι πολύ αποτελεσματική (Εικ.17).

Στη συνέχεια έγινε μεταφορά των σφαιριδίων σε στήλη χρωματογραφίας και πλύση τους με διάλυμα Α, διάλυμα στήλης [20mM Hepes (pH 7.3), 1.5% octyl glucoside και αναστολείς πρωτεασών Complete 1X] και έκλουση του SR-BI με διάλυμα έκλουσης (διάλυμα στήλης και 200μM του πεπτιδικού επιτόπου t1].

Προκειμένου να εκτιμηθεί το ποσοστό του υποδοχέα που εκλούεται, σε σχέση με την ποσότητα που προσδένεται αρχικά στα σφαιρίδια σεφαρόζης-1D4, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western στην οποία συνεκρίθη η ένταση της ζώνης του εκλουθέντος SR-BI με τη ζώνη που αντιστοιχεί στο αρχικό κυτταρικό εκχύλισμα (Εικ.17). Για παράδειγμα, αν το αρχικό εκχύλισμα είχε όγκο 60ml και ο ολικός όγκος έκλουσης ήταν 10ml, αυτό

σημαίνει ότι κατά τη χρωματογραφία, ο mSR-BI-t1 συμπυκνώθηκε έξι φορές (Εικ. 17). Έτσι, το δείγμα που προέκυψε από την έκλουση *αραιώθηκε* έξι φορές και έγινε ανάλυση



Εικ. 17. Ανάλυση Western για την Εκτίμηση της Αποτελεσματικότητας της Πρόσδεσης της mSR-BI-t1 Από τα Σφαιρίδια 1D4-Σεφαρόζης και της Απόδοσης της Έκλουσης του mSR-BI-t1 κατά τη Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας

Western με ισοδύναμο όγκο του αρχικού κυτταρικού εκχυλίσματος. Από τη σύγκριση της έντασης του σήματος του mSR-BI-t1 στα δύο δείγματα, διεφάνη ότι ο υποδοχέας εκλούεται σε υψηλό ποσοστό από τα σφαιρίδια.

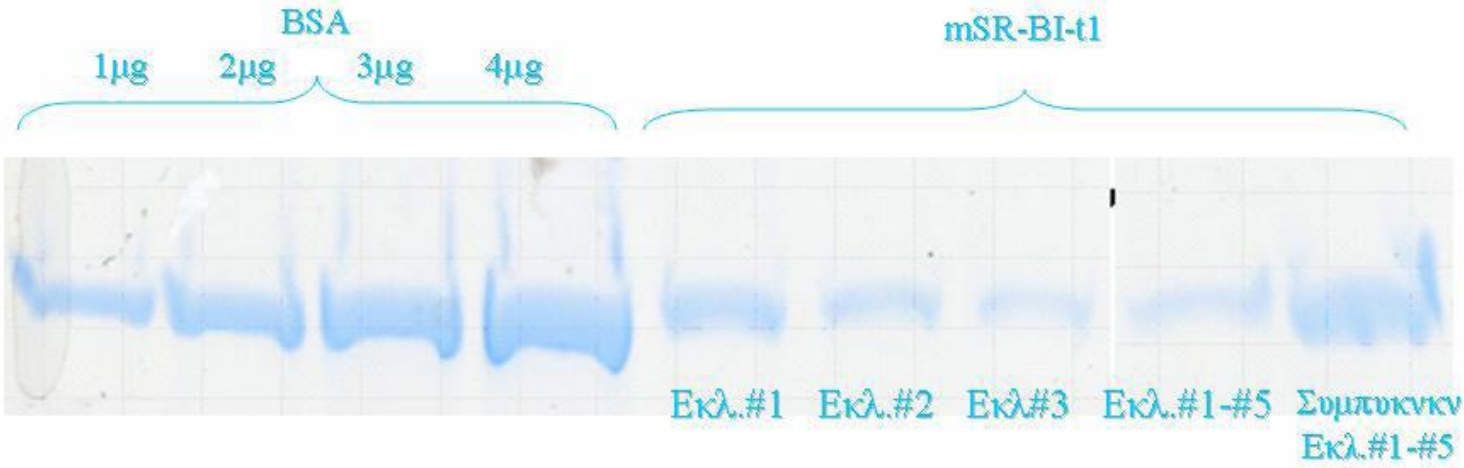
Η ποσότητα του απομονωμένου υποδοχέα προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση 25 μl από κάθε έλουση, 25 μl ισόποσου μίγματος όλων των εκλούσεων και ορισμένου όγκου (συνήθως 3 μl) συμπυκνωμένου δείγματος σε συγκέντρωση περίπου 1-2mg/ml, σε πηκτή SDS/πολυακρυλαμίδης (8%), παράλληλα με γνωστές ποσότητες BSA. Με σύγκριση της έντασης της χρώσης Coomasie των διαφόρων πρωτεϊνικών ζωνών εν σχέσει με τις ζώνες BSA, βρέθηκε ότι ανά 5.5L καλλιέργειας, παράγονται περίπου 5-8 mg καθαρού mSR-BI-t1. Για παράδειγμα, 2.5 μl συμπυκνωμένου δείγματος mSR-BI-t1 βρέθηκε ότι περιέχουν ~4μg mSR-BI-t1. Επομένως, στα 4ml ολικού συμπυκνωμένου δείγματος περιέχονται 7mg mSR-BI-t1 (Εικ. 18).

Μετά τον καθαρισμό με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας, τα δείγματα του απομονωμένου υποδοχέα που προορίζονταν για άμεση ανάλυση με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και ιοντοανταλλαγής (βλέπε πιο κάτω), διατηρήθηκαν στους 4°C. Αντιθέτως, τα δείγματα που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν αργότερα, π,χ, για τη δοκιμασία των λιποσωμάτων (βλέπε πιο κάτω), διατηρήθηκαν στους -20 ^{o}C, καθώς στη θερμοκρασία αυτή ελαχιστοποιείται η δράση των πρωτεασών. Σε κάθε περίπτωση, αποφεύχθηκε η έκθεση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς πιστεύεται ότι αυτή μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ολιγομερών.

8. Έλεγχος της Λειτουργικότητας της Απομονωμένης Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με τη Δοκιμασία των Λιποσωμάτων

Από τις δοκιμασίες πρόσληψης της φθορίζουσας ένωσης DiI από την DiI-HDL και πρόσδεσης της ^{125}I-HDL, σε κύτταρα που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή του mSR-BI-t1, διεφάνη ότι αυτή είναι λειτουργική. Προκειμένου, όμως, να προχωρήσουμε σε δοκιμασίες κρυστάλλωσης, έπρεπε να βεβαιωθούμε ότι και σε καθαρή μορφή ο SR-BI-t1 είναι λειτουργικός. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμασία βασισμένη στην

ανασύσταση της απομονωμένης πρωτεΐνης σε λιποσώματα χοληστερόλης (CHOL)/ φωσφατιδυλχολίνης (PC) και στη μέτρηση της πρόσδεσης της ^{125}I-HDL και της πρόσληψης των [^{3}H]-αιθέρων χοληστερόλης (CE) από [^{3}H]CE-HDL, στα εν λόγω πρωτεολιποσώματα (137).



Εικ. 18. SDS-PAGE και Χρώση Coomasie για τον Προσδιορισμό της Απόδοσης του Καθαρισμού του mSR-BI-t1 σε Μεγάλη Κλίμακα με Σύγκριση Δειγμάτων Έκλουσης του Απομονωμένου Υποδοχέα με Γνωστές Ποσότητες BSA

Η δοκιμασία αυτή συνεπάγεται επώαση των πρωτεολιποσωμάτων (για κάθε διαφορετική συνθήκη χρησιμοποιούνται δείγματα εις τετραπλούν) με ραδιοσεσημασμένες λιποπρωτεΐνες [^{125}I-HDL/LDL για τον προσδιορισμό της ικανότητας πρόσδεσης στον mSR-BI-t1 και ^{3}H-CE-HDL/LDL για τον προσδιορισμό της ικανότητας της mSR-BI-t1 να προσλαμβάνει αιθέρες χοληστερόλης (CE)]. Τα πειράματα έγιναν σε σταθερή συγκέντρωση λιποπρωτεϊνών (10μg/ml πρωτεΐνης λιποπρωτεϊνών) και επώαση για δύο ώρες στους 37°C. Μετά την επώαση, έγινε διήθηση του μείγματος σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης και εμετρήθη η ραδιενέργεια που οφείλεται στην πρόσδεση της ^{125}I-HDL καθώς και ή πρόσληψη των [^{3}H]-CE. Ο υπολογισμός της ποσότητας της ^{125}I-HDL που προσδένεται και των [^{3}H]-CE που προσλαμβάνονται από τα λιποσώματα, σε ng, επροσδιορίσθη από το λόγο της τιμής της ραδιενέργειας των φίλτρων μετά από τη διήθηση και έκπλυση, προς την τιμή της ειδικής ενεργότητας της ραδιοσημασμένης HDL ή LDL. Η ειδική ενεργότητα είναι η ραδιενέργεια ανά μονάδας μάζας της απολιποπρωτεΐνης ή των εστέρων χοληστερόλης της HDL (ή της LDL, όπου αυτή χρησιμοποιήθηκε). Το μέγεθος αυτό (ειδική ενεργότητα) χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση των μετρήσεων γ-ακτινοβολίας και σπινθηρισμού, των φίλτρων. Για παράδειγμα, εάν 1 μg της ^{125}I-HDL που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία πρόσδεσης, δώσει 1000 κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute, cpm) στο μετρητή γ-ακτινοβολίας, αυτό σημαίνει ότι η ειδική ενεργότητα της ^{125}I-HDL είναι 1000 cpm/ng. Στο ίδιο πείραμα, άν η μέτρηση ενός φίλτρου είναι 20.000 cpm, αυτό σημαίνει ότι η πρόσδεση που αντιστοιχεί σε αυτό το φίλτρο είναι 20.000 cpm/ 1000 cpm/ng = 20 ng.

Κατά τη δοκιμασία πρόσληψης των ραδιοσημασμένων αιθέρων χοληστερόλης, αναπόφευκτα μετράται και η ραδιενέργεια η προερχόμενη από την *πρόσδεση* των σωματιδίων [^{3}H]-CE-HDL στην επιφάνεια των λιποσωμάτων και όχι μόνο από την πρόσληψη των [^{3}H]-CE στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Το συνολικό μετρώμενο αυτό μέγεθος ονομάζεται *φαινόμενη* πρόσληψη αιθέρων χοληστερόλης. Η *επιλεκτική* πρόσληψη αιθέρων χοληστερόλης προκύπτει από των αφαίρεση της τιμής της ειδικής πρόσδεσης της ραδιοσημασμένης HDL ή LDL από την τιμή της φαινόμενης πρόσληψης ραδιοσημασμένων αιθέρων χοληστερόλης.

Για τον έλεγχο της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάσματα λιποσωμάτων χωρίς mSR-BI-t1 (w/o SR-BI), δείγματα χωρίς προσθήκη πρωτεολιποσωμάτων (-lip.), καθώς και δείγματα όπου γίνεται επώαση πρωτεολιποσωμάτων με περίσσεια (X40) μη-σεσημασμένης λιποπρωτεΐνης (X40 HDL ή X40 LDL). Η μη-σεσημασμένη λιποπρωτεΐνη ανταγωνίζεται τη σεσημασμένη για την πρόσδεση στον mSR-BI-t1 και επομένως επιτρέπει τον υπολογισμό της μη-ειδικής πρόσδεσης και πρόσληψης. Αφαίρεση της τιμής της μη-ειδικής πρόσδεσης και πρόσληψης, από τις αντίστοιχες ολικές τιμές, επιτρέπει τον υπολογισμό της *ειδικής* πρόσδεσης και πρόσληψης. Για κάθε έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εις διπλούν.

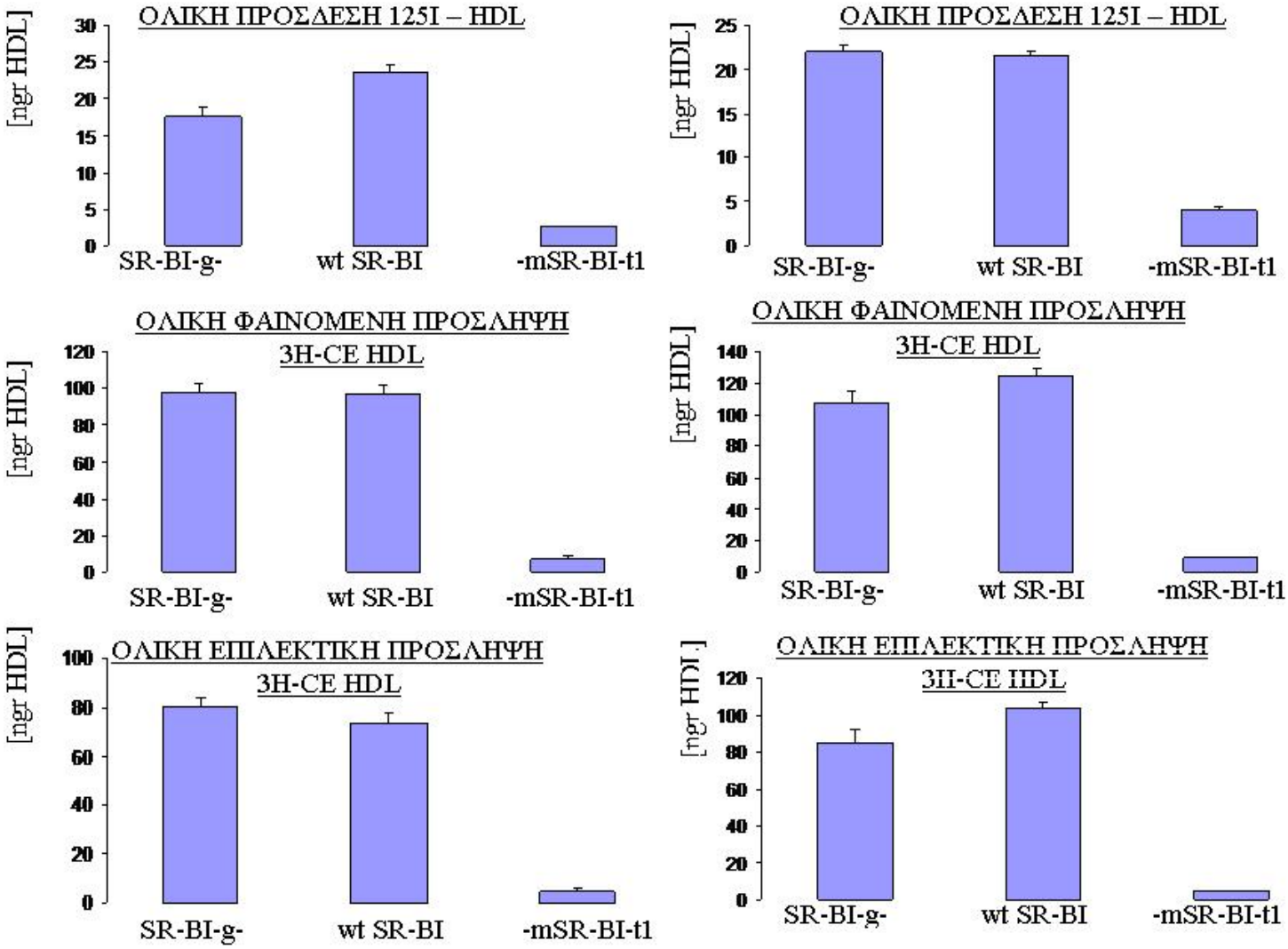
Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας, με χρήση μίας συγκεκριμένης συγκέντρωσης ^{125}I-HDL και [^{3}H]-CE-HDL (10μg/ml), έδειξαν ότι η καθαρή μεταλλαγμένη πρωτεΐνη mSR-BI-t1 (SR-BI-g-) προσδένει την ^{125}I-HDL και προσλαμβάνει τους αιθέρες της χοληστερόλης από την [^{3}H]-CE-HDL και μάλιστα σε επίπεδα παρόμοια με την αγρίου τύπου mSR-BI-t1 (Εικ.19). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το αποτέλεσμα της δοκιμασίας πρόσδεσης κορεσμού της ^{125}I-HDL σε κύτταρα που εκφράζουν τις δύο μορφές του mSR-BI-t1, που περιεγράφη πιο πάνω. Πέραν όμως, της διαπίστωσης της λειτουργικότητας της καθαρισμένης μορφής mSR-BI-t1, η δοκιμασία των λιποσωμάτων επέτρεψε την πραγματοποίηση μιας σειράς πειραμάτων που οδήγησαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τη βιοχημική (και πιθανώς και τη βιολογική) συμπεριφορά του mSR-BI-t1. Τα πειράματα αυτά αφορούν στη μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων, στη λειτουργία του υποδοχέα και παρουσιάζονται κατωτέρω.

9. Μελέτη της Αλληλεπίδρασης της HDL και της LDL με τον mSR-BI-t1 με Χρήση της Δοκιμασία των Λιποσωμάτων

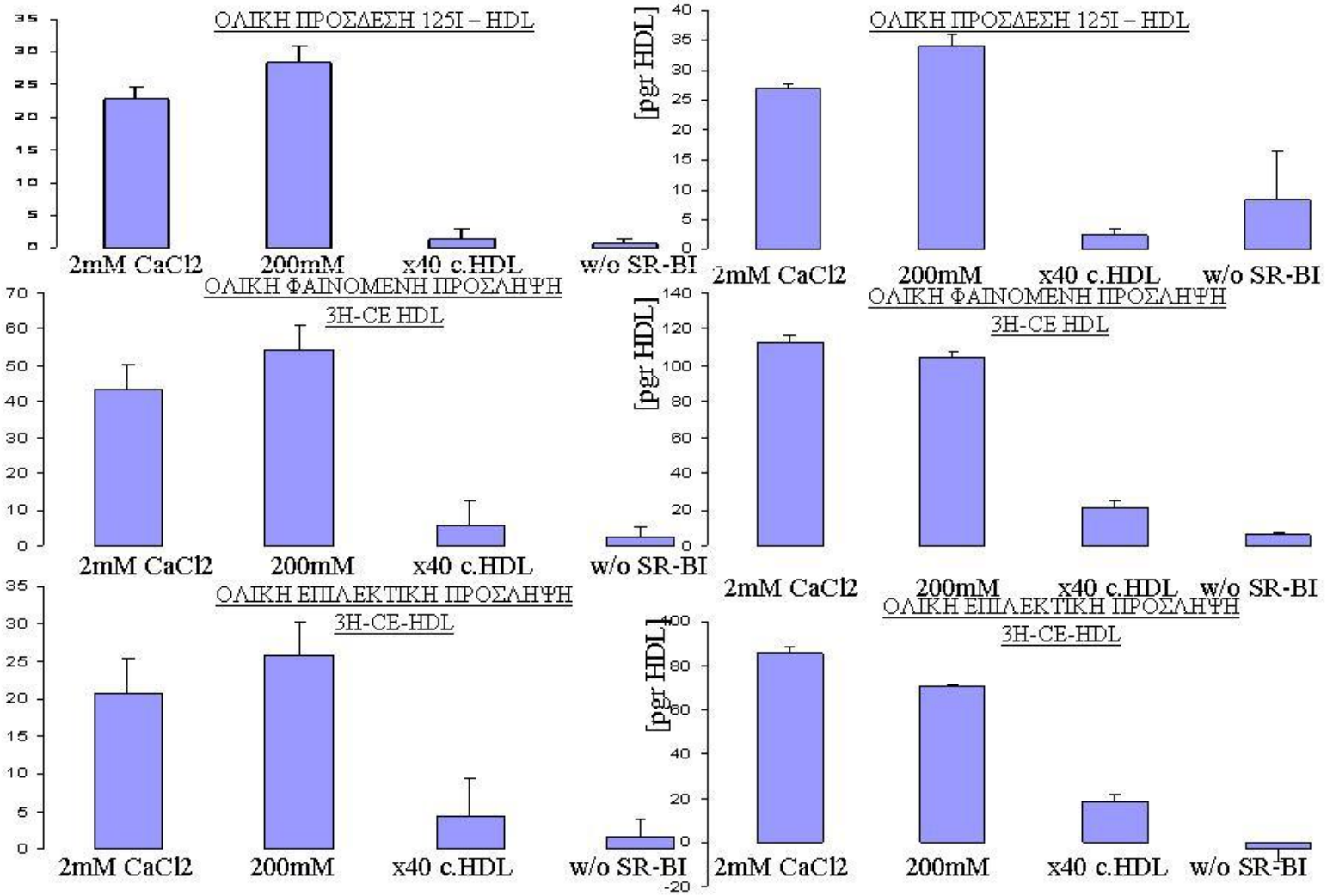
Με τη δοκιμασία των λιποσωμάτων φάνηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ στο ρυθμιστικό διάλυμα επώασης των πρωτεολιποσωμάτων με τη ραδιοσημασμένη HDL, από 2mM σε 200mM οδηγεί σε μικρή αύξηση της πρόσδεσης της HDL (αλλά όχι και της πρόσληψης των αιθέρων χοληστερόλης από αυτήν) (Εικ.20).

.

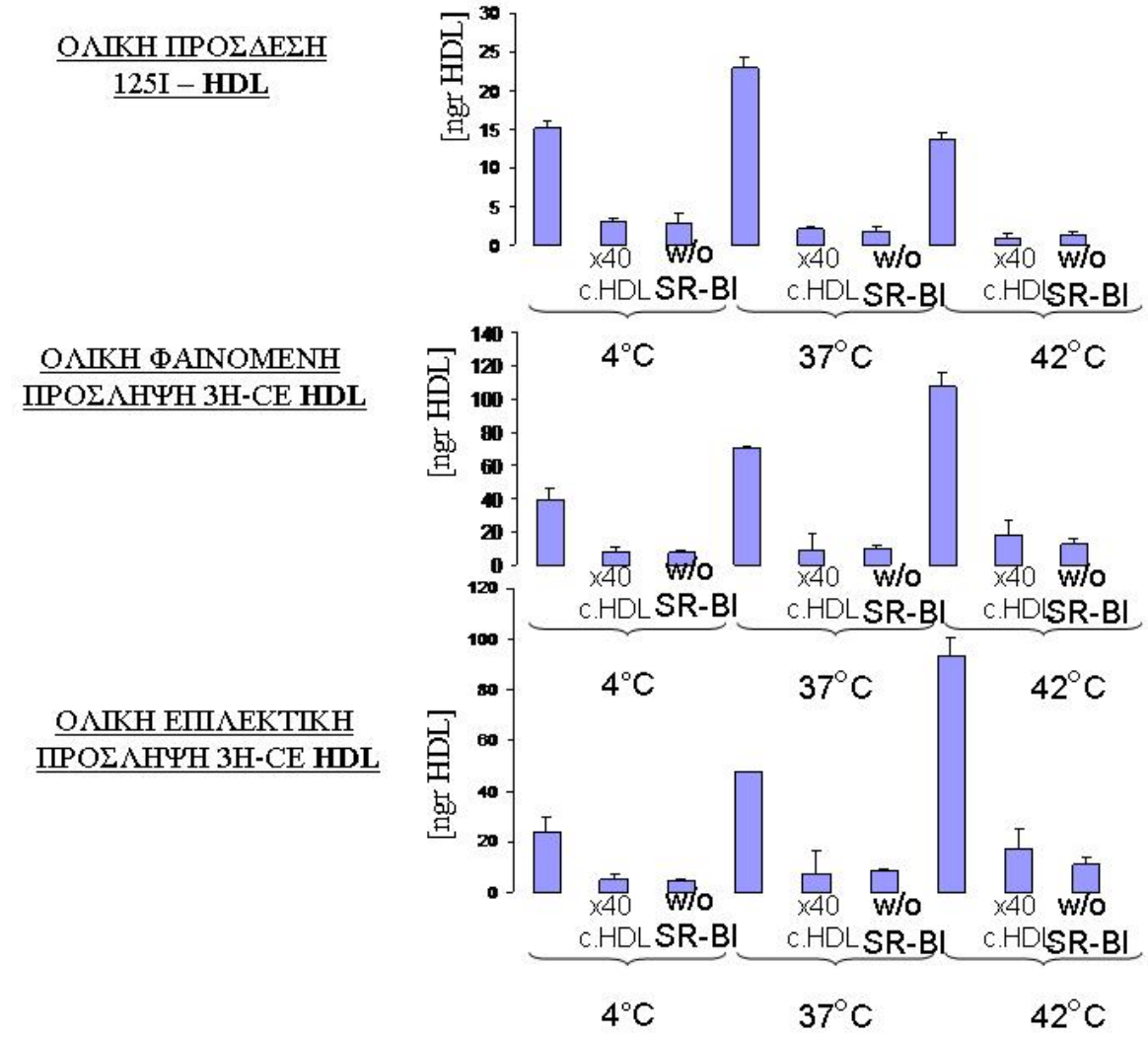
Επιπλέον, η πρόσδεση της ^{125}I-HDL στα πρωτεολιποσώματα είναι μεγαλύτερη στους 37°C συγκριτικά με τους 4°C και τους 42°C (Εικ.21), ενώ η πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 4°C στους 42°C (Εικ.22). Το ίδιο συμβαίνει και με την πρόσδεση της ^{125}I-LDL (Εικ.23) και την πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης από την [^{3}H]-CE-LDL (Εικ.24).



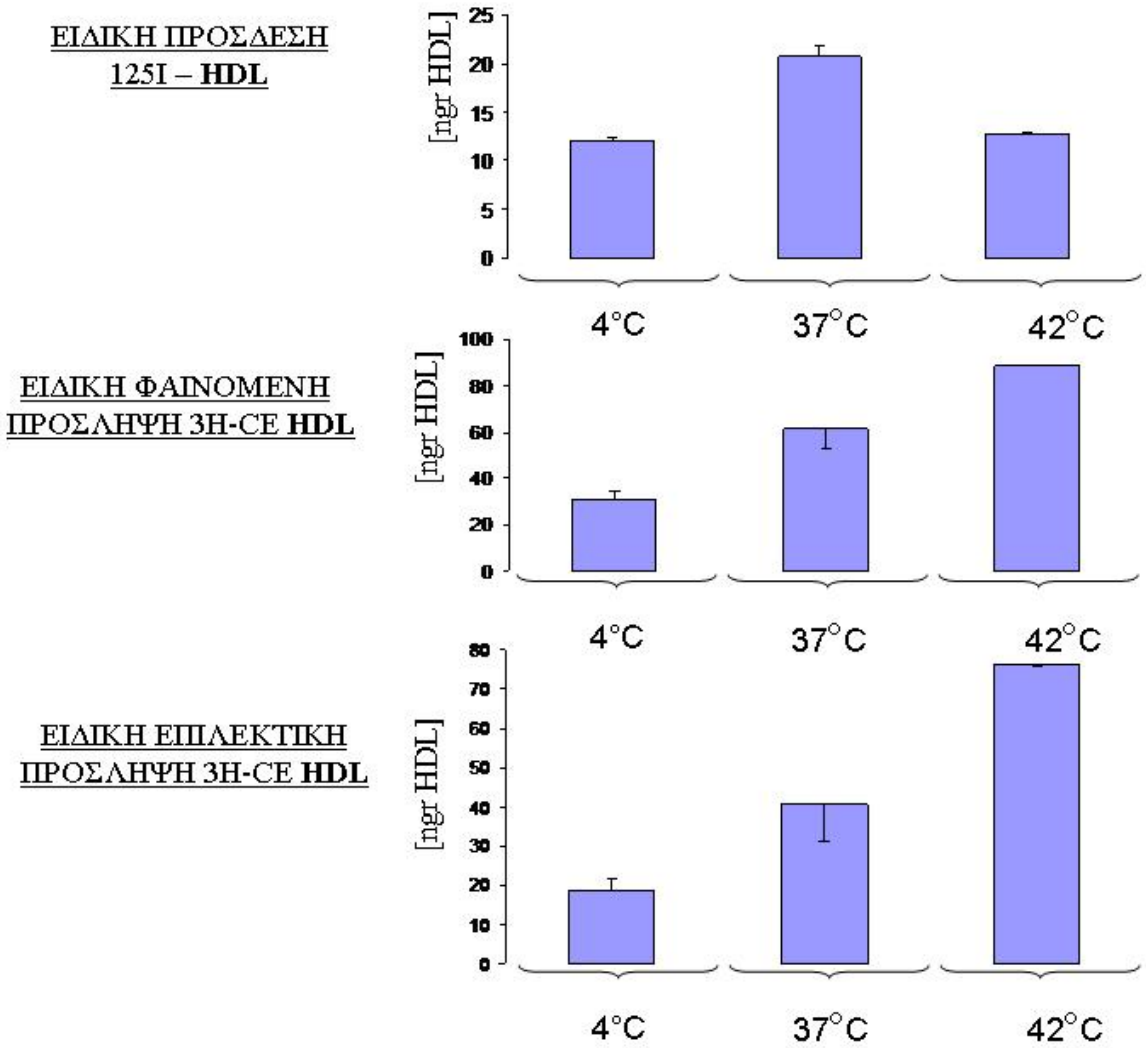
Εικ. 19. Επίδραση της Γλυκοζυλίωσης του mSR-BI-t1 στην Πρόσδεση της 125I-HDL και την Πρόσληψη Αιθέρων Χοληστερόλης 3H-CE από την 3H-CE-HDL σε Πρωτεολιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης/Χοληστερόλης/mSR-BI-t1. Παρουσιάζονται τα Αποτελέσματα Δύο Ανεξάρτητων Πειραμάτων.



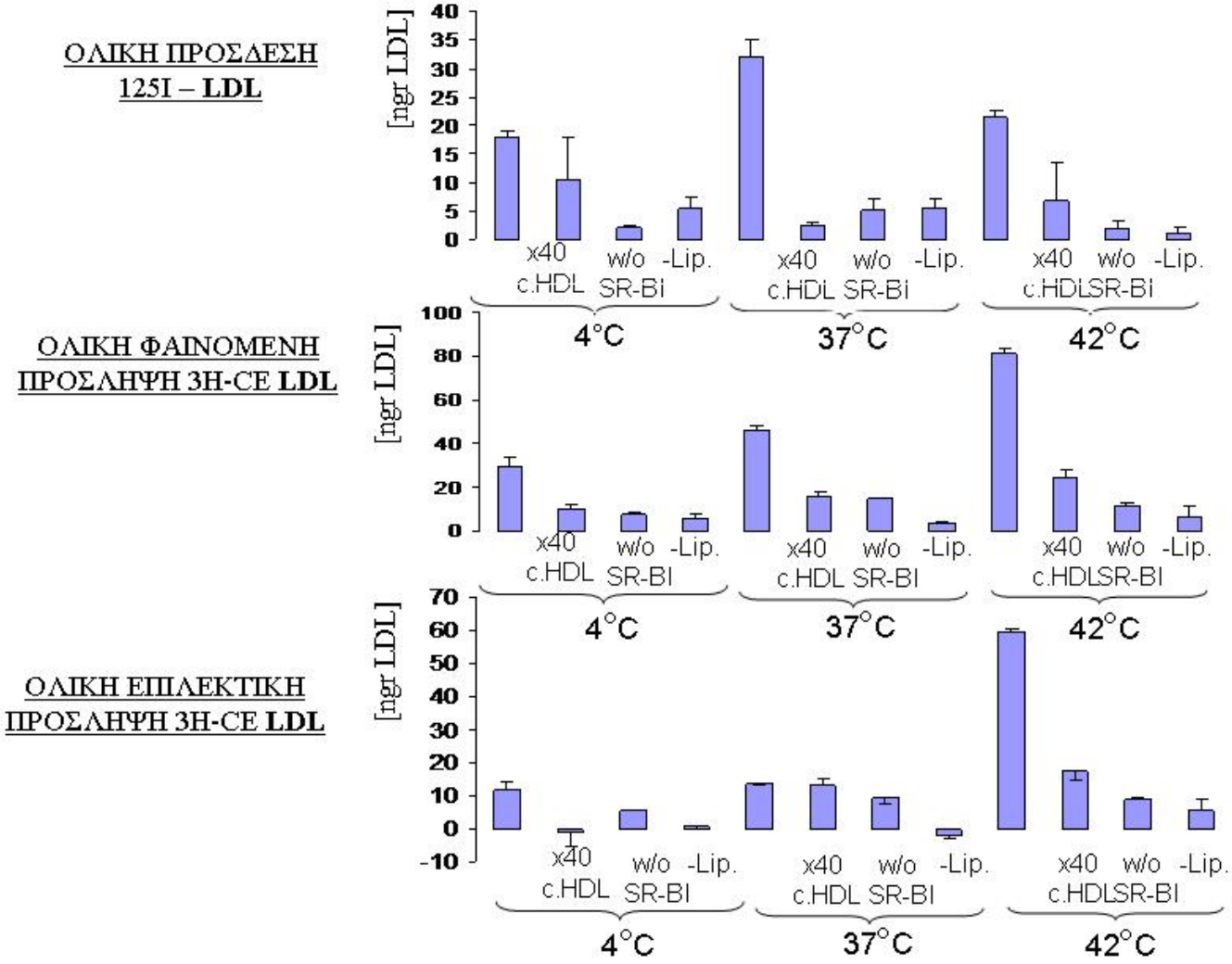
Εικ. 20. Επίδραση της Συγκέντρωσης του CaCl2 στην Πρόσδεση της 125I-HDL και την Πρόσληψη Αιθέρων Χοληστερόλης [3H]-CE από την [3H]-CE-HDL. Παρουσιάζονται τα Αποτελέσματα Δύο Ανεξάρτητων Πειραμάτων.



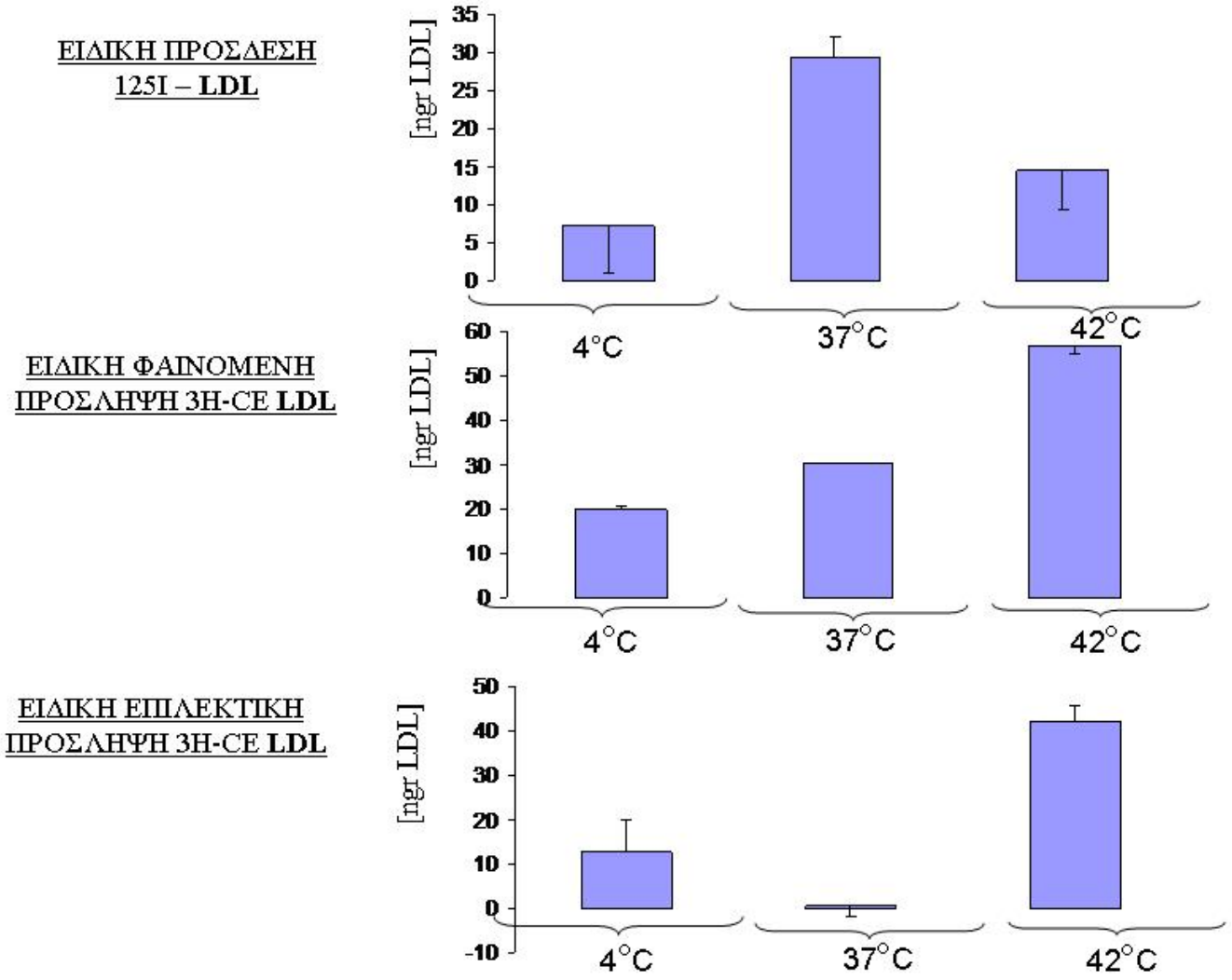
Εικ. 21. Επίδραση της Θερμοκρασίας στην Ολική Πρόσδεση της 125I-HDL και στην Ολική Πρόσληψη των Αιθέρων Χοληστερόλης 3H-CE από την H-CE-HDL σε Πρωτεολιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης/Χοληστερόλης/mSR-BI-t1. Η Πρόσδεση της 125I-HDL είναι Μέγιση στους 37°C και η Πρόσληψη των 3H-CE είναι Μέγιστη στους 42°C.



Εικ. 22. Επίδραση της Θερμοκρασίας στην Ειδική Πρόσδεση της 125I-HDL και την Ειδική Πρόσληψη των Αιθέρων Χοληστερόλης 3H-CE από την 3H-CE-HDL σε Πρωτεολιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης/Χοληστερόλης/mSR-BI-t1. Η Πρόσδεση της 125I-HDL είναι Μέγιστη στους 37°C και η Πρόσληψη των Αιθέρων Χοληστερόλης είναι Μέγιστη στους 42°C.



Εικ. 23. Επίδραση της Θερμοκρασίας στην Ολική Πρόσδεση της 125I-LDL και την Ολική Πρόσληψη 3H-CE από την 3H-CE-LDL σε Πρωτεολιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης/Χοληστερόλης/mSR-BI-t1. Η Πρόσδεση της 125I-LDL είναι Μέγιστη στους 37°C και η Πρόσληψη των 3H-CE από την 3H-CE-LDL είναι Μέγιστη στους 42°C.



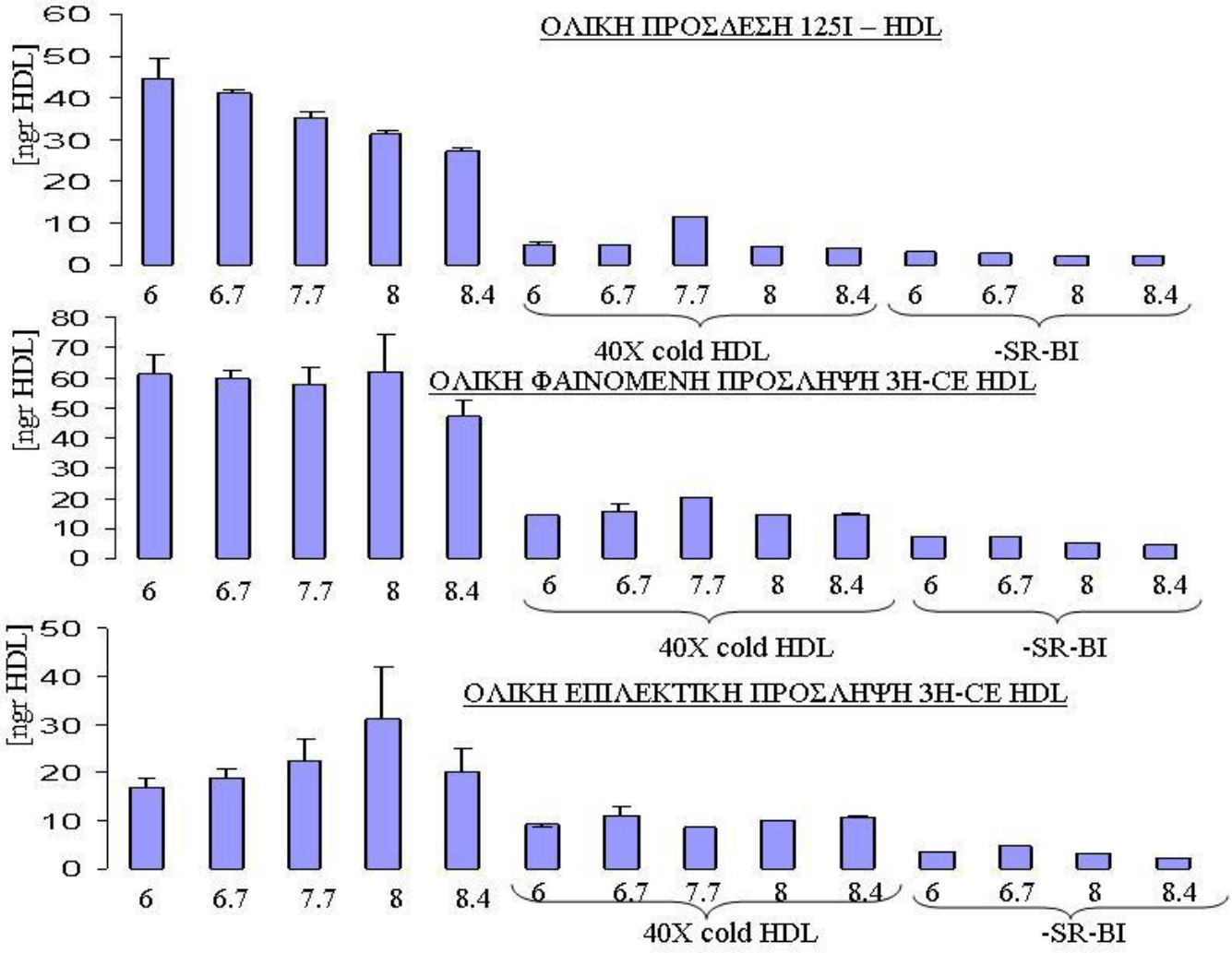
Εικ. 24. Επίδραση της Θερμοκρασίας στην Ειδική Πρόσδεση της 125I-LDL και την Ειδική Πρόσληψη 3H-CE από την 3H-CE-LDL σε Πρωτεολιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης/Χοληστερόλης/mSR-BI-t1. Η Πρόσδεση της 125I-LDL είναι Μέγιστη στους 37°C και η Πρόσληψη των 3H-CE από την 3H-CE-LDL είναι Μέγιστη στους 42°C.

Ένα από τα πιο σημαντικά ευρήματα ήταν το ότι η αύξηση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος επώασης των πρωτεολιποσωμάτων με τη ραδιοσημασμένη HDL, μειώνει την πρόσδεση της ^{125}I-HDL, ενώ η πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης δεν παρουσιάζει σαφή τάση αύξησης ή μείωσης (Εικ.25).

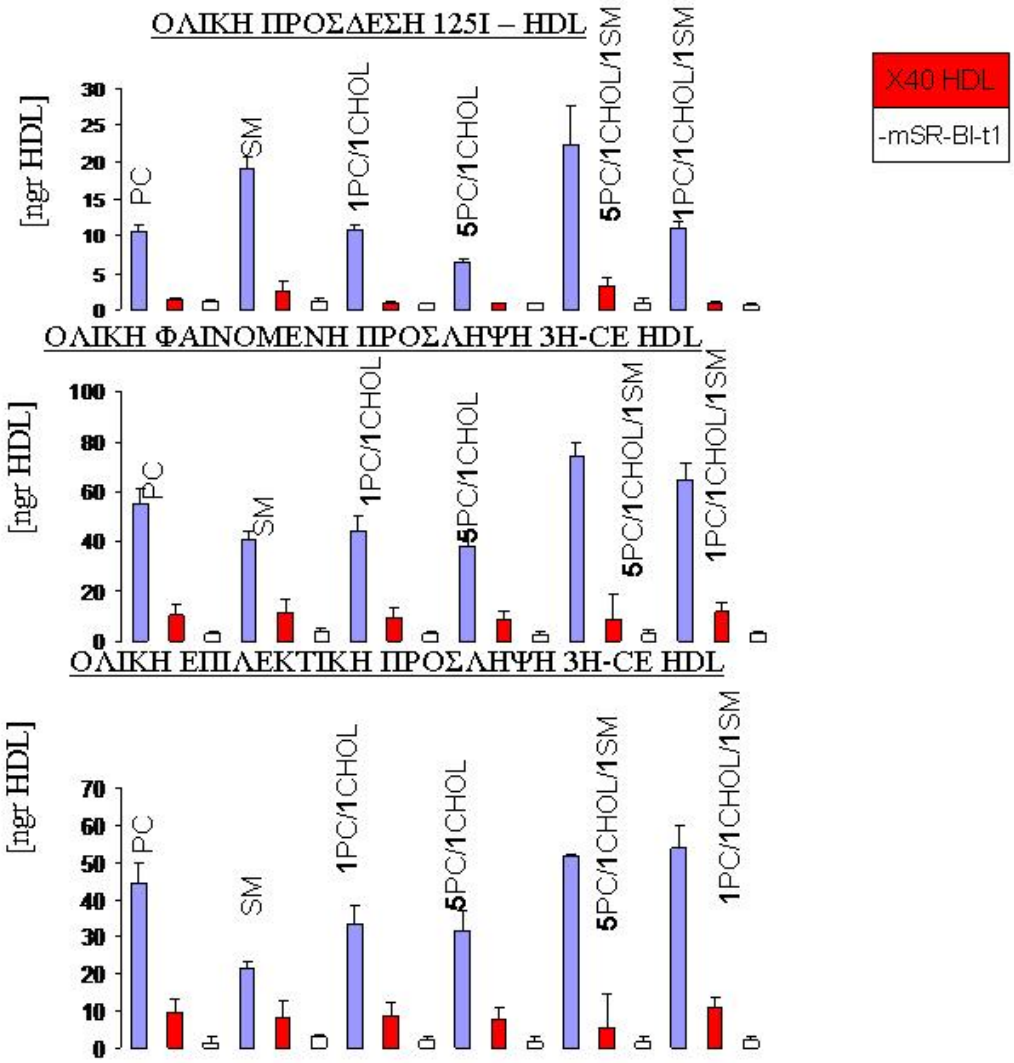
Σε κυτταροκαλλιέργειες και υπό ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης, οι SR-BI και SR-BII φαίνεται να συγκεντρώνονται σε περιοχές (microdomains) της πλασματικής μεμβράνης, πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια, οι οποίες καλούνται καβεόλες (15,18). Η συγκέντρωση του SR-BI στα caveolae δείχνει ότι αυτές ή παρόμοιες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να είναι σημαντικές για την εξαρτώμενη από τον SR-BI μεταφορά χοληστερόλης μεταξύ των λιποπρωτεϊνών και των κυττάρων (15). Για να διερευνηθεί ο ρόλος των λιπιδίων στη δράση του SR-BI, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία των λιποσωμάτων με λιποσώματα διαφόρων αναλογιών χοληστερόλης (CHOL) και φωσφατιδυλχολίνης (PC), καθώς και με λιποσώματα εμπλουτισμένα με διαφορετικές ποσότητες σφιγγομυελίνης (SM) (Εικ. 26, Εικ. 27, Εικ. 28, Εικ. 29) και ακολούθησε μελέτη της επιδρασης των μεταβολών αυτών στην πρόσδεση της ^{125}I-HDL και την πρόσληψη των [^{3}H]-αιθέρων χοληστερόλης (CE) από την [^{3}H]-CE-HDL.Τα πειράματα έδειξαν ότι η προσθήκη σφιγγομυελίνης σε αυξανόμενη αναλογία αυξάνει την πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης από την HDL ενώ δεν μεταβάλλει σημαντικά την πρόσδεση της ^{125}I-HDL (Εικ. 29).

10. Εκτίμηση της Ποιότητας της Απομονωμένης Πρωτεΐνης mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης και Ανταλλαγής Ιόντων και Εύρεση των Βέλτιστων Συνθηκών για την Κρυστάλλωσή της

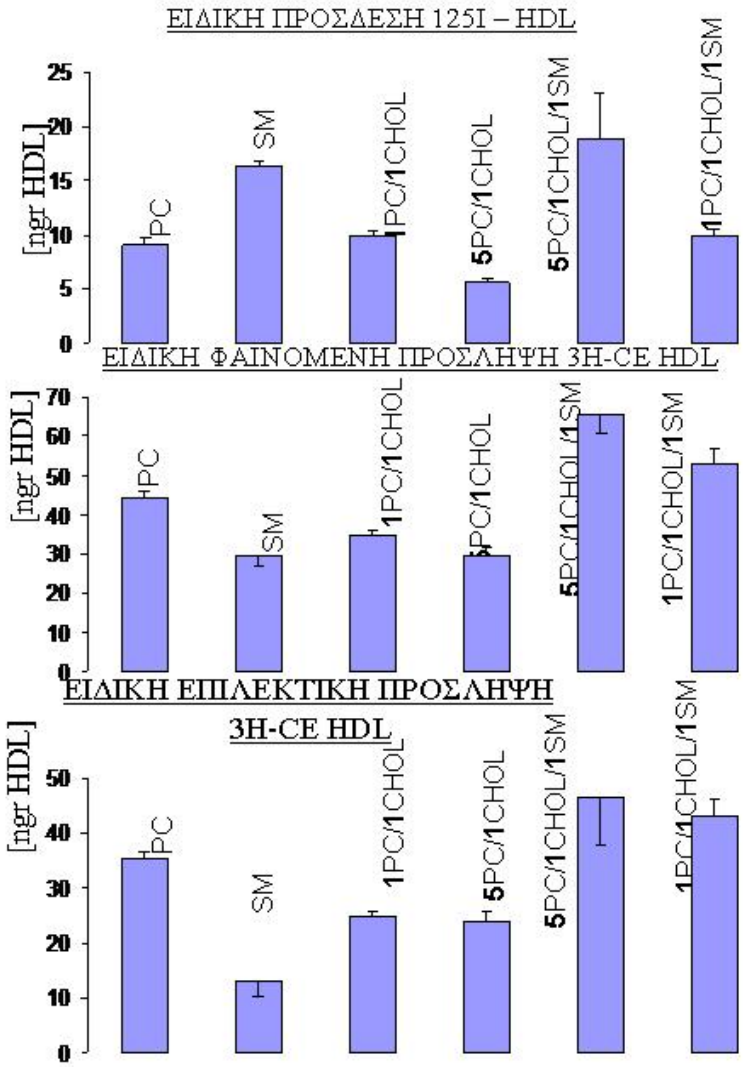
Η ποιότητα (καθαρότητα, ομοιογένεια κλπ.) των πρωτεϊνικών δειγμάτων του mSR-BI-t1 που παρήχθησαν με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας αναλύθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (size exclusion chromatography), σε συνεργασία με το εργαστήριο του καθηγητή Robert Stroud στο UCSF (University of California San Francisco). Ο στόχος ήταν η εύρεση συνθηκών που να παράγουν καθαρό, ομοιογενή και σταθερό πληθυσμό συμπλεγμάτων πρωτεϊνών-απορρυπαντικού (PDC, Protein Detergent



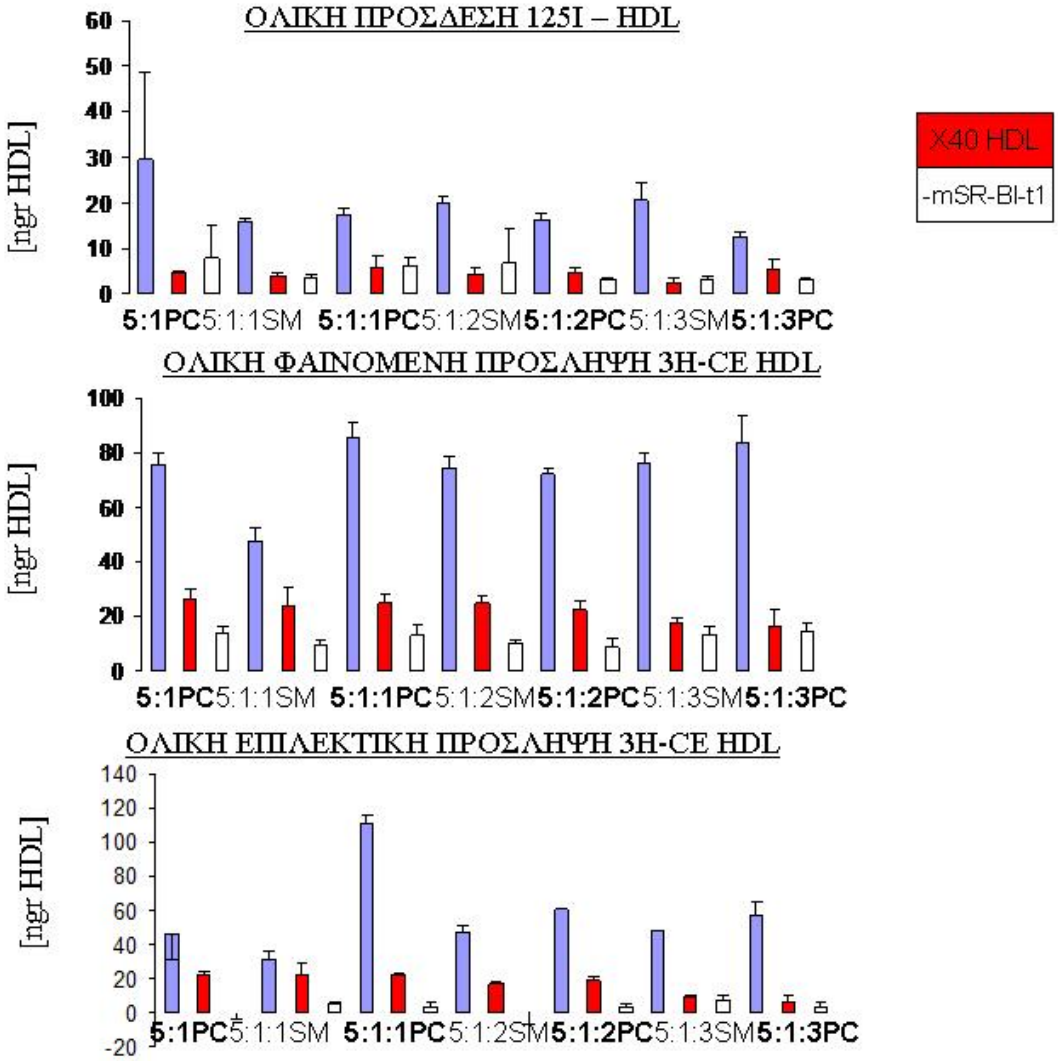
Εικ. 25. Επίδραση του pH στην Πρόσδεση της 125I-HDL και την Πρόσληψη Αιθέρων Χοληστερόλης 3H-CE από την 3H-CE-HDL. Η Αύξηση του pH Μειώνει την Πρόσδεση της 125I-HDL αλλά όχι την Πρόσληψη 3H-CE.



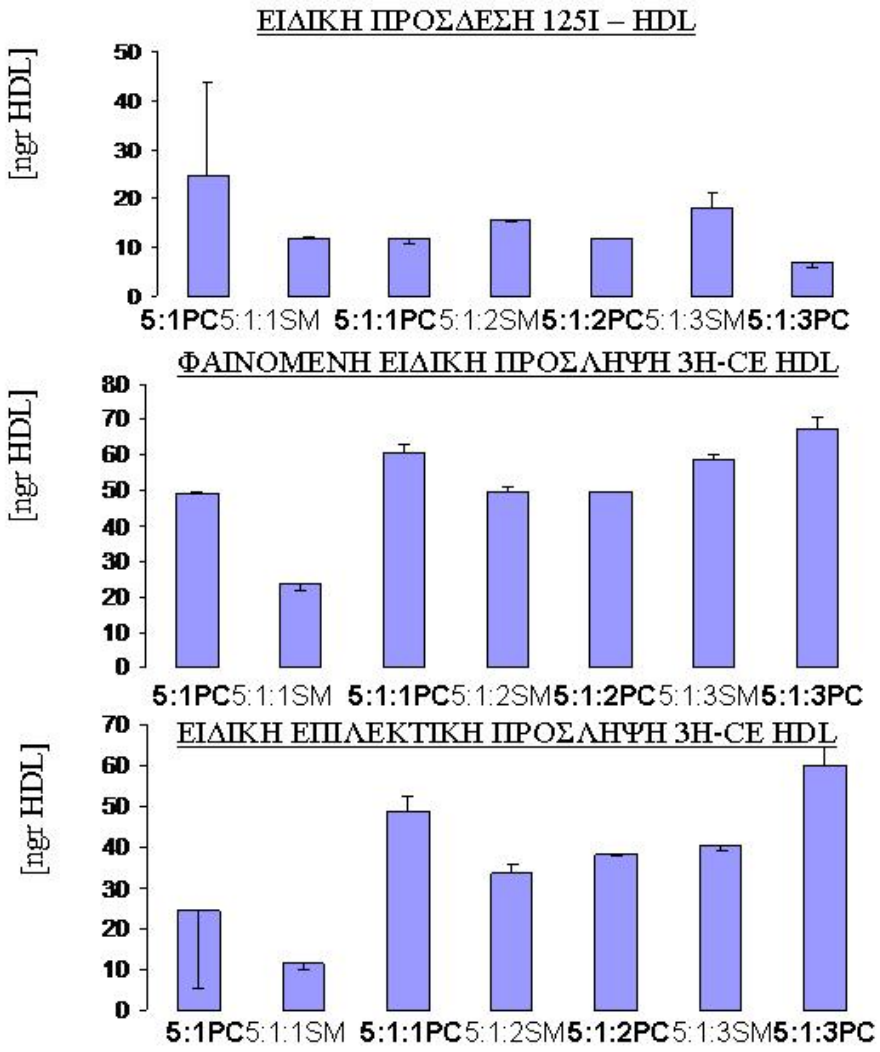
Εικ. 26. Επίδραση της Σύστασης των Πρωτεολιποσωμάτων στην Ολική Πρόσδεση της 125I-HDL και την Ολική Πρόσληψη των Αιθέρων Χοληστερόλης [3H]-CE από την [3H]-CE-HDL



Εικ. 27. Επίδραση της Σύστασης των Πρωτεολιποσωμάτων στην Ειδική Πρόσδεση της 125I-HDL και την Ειδική Πρόσληψη των Αιθέρων Χοληστερόλης 3H-CE από την 3H-CE-HDL.



Εικ. 28. Επίδραση της Σύστασης των Πρωτεολιποσωμάτων στην Ολική Πρόσδεση της 125I-HDL και την Ολική Πρόσληψη των Αιθέρων Χοληστερόλης 3H-CE από την 3H-CE-HDL. Στην Τυπική Μοριακή Αναλογία 5:1 της Φωσφατιδυλχολίνης και Χοληστερόλης Προστέθηκαν Αυξανόμενα Μέρη Φωσφατιδυλχολίνης (PC) ή Σφιγγομυελίνης (SM).



Εικ. 29. Επίδραση της Σύστασης των Πρωτεολιποσωμάτων στην Ειδική Πρόσδεση της 125I-HDL και την Ειδική Πρόσληψη των Αιθέρων Χοληστερόλης 3H-CE από την 3H-CE-HDL. Στην Τυπική Μοριακή Αναλογία 5:1 της Φωσφατιδυλχολίνης και Χοληστερόλης Προστέθηκαν Αυξανόμενα Μέρη Φωσφατιδυλχολίνης (PC) ή Σφιγγομυελίνης (SM).

Complex) για κρυστάλλωση και για χρήση στη δοκιμασία των λιποσωμάτων που περιεγράφη πιο πάνω.

Για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, η στατική φάση (π.χ. Sephadex) επακεταρίσθη σε στήλη. Το κατάλληλο «πακετάρισμα» της στήλης ήταν σημαντικό για τη μεγιστοποίηση της διαχωριστικής της ικανότητας. Η υπερφόρτωση της στήλης μπορεί να οδηγήσει σε κατάρρευση των πόρων των σφαιριδίων και μείωση της διαχωριστικής της ικανότητας. Από την άλλη πλευρά, το ανεπαρκές πακετάρισμα της στήλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της συνολικής επιφάνειας της στατικής φάσης με αποτέλεσμα μικρά μόρια πρωτεϊνών ή άλλων πολυμερών να περνούν μικρότερο χρόνο παγιδευμένα στους πόρους (βλέπε πιο κάτω). Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία ήταν οι TSK G3000SW (σφαιρίδια πολυμεθακρυλίου) 0.75 x 60cm, για pH < 7.5 και οι Sephadex 10/30, για pH > 7.5. Τα πειράματα έδειξαν ότι ο XL τύπος της στήλης TSK δεν ήταν κατάλληλος, διότι εκτός του ότι έχει μήκος μόνο 30 cm και επομένως περιορισμένη διαχωριστική ικανότητα (βλέπε πιο κάτω), χρησιμοποιεί επιπλέον σωματίδια μικροτέρου μεγέθους, τα οποία είναι πιο συμπιεστά. Έτσι, κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας σε FPLC, αναπτύχθησαν μεγάλες πιέσεις εξαιτίας του μεγάλου ιξώδους της κινητής φάσης, ιδιαιτέρως όταν η χρωματογραφική έκλουση έγινε παρουσία γλυκερόλης στην κινητή φάση. Οι στήλες TSK που χρησιμοποιήθηκαν, κατασκευάζονται από την TOSOH BIOSCIENCE (column part #: 05103). Οι παραπάνω στήλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και εν σειρά, προκειμένου να αυξηθεί το συνολικό μήκος της στήλης. Όπως συμβαίνει και με τις άλλες τεχνικές χρωματογραφίας, η αύξηση του μήκους της στήλης αυξάνει και τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου, ενώ η αύξηση της διαμέτρου της στήλης αυξάνει τη χωρητικότητά της.

Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε κατά κανόνα ήταν 20mM κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος βάσει της επιθυμούμενης τιμής pH (αρχικά Hepes, pH 7.2), 100mM NaCl, 40mM Octyl Glucoside, 20% (όγκος/όγκος) γλυκερόλη και 2mM DTT. Το απορρυπαντικό Octyl Glucoside ήταν το προτιμώμενο απορρυπαντικό κινητής φάσης στην εργασία αυτή, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε δοκιμασίες κρυστάλλωσης και άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, διυλίζεται εύκολα, προσφέρεται για το σχηματισμό

λιποσωμάτων ανασυστημένων με μεμβρανικές πρωτεΐνες και χρησιμοποιείται επιτυχώς στη χρωματογραφική ανάλυση πολλών μεμβρανικών πρωτεινών, καθώς εξασφαλίζει ομοιογένεια και διαλυτότητα των δειγμάτων.

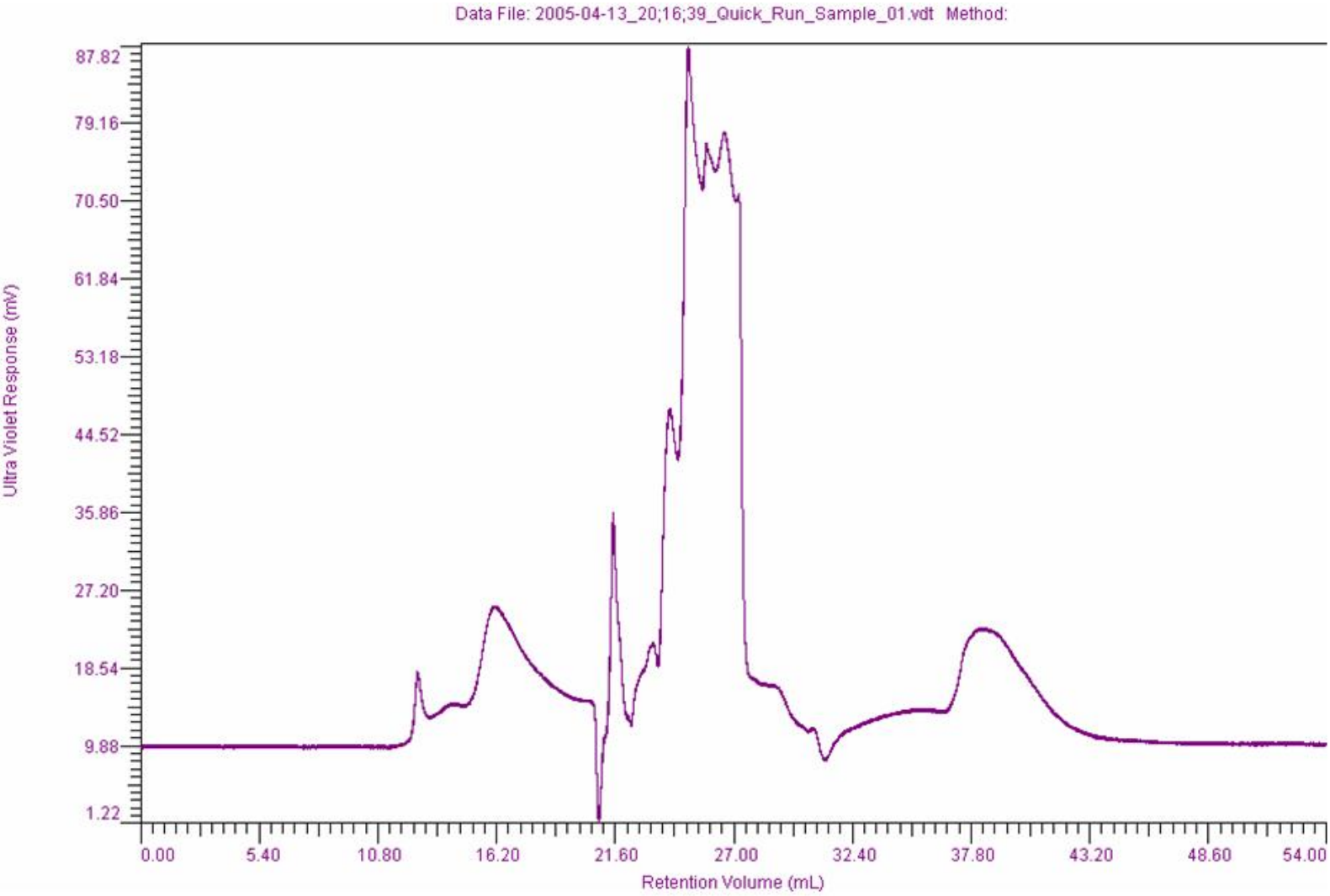
Η κινητή φάση υπεβλήθη σε διήθηση πριν τη χρωματογραφία για απομάκρυνση των αερίων που έχουν διαλυτοποιηθεί σε αυτήν (degass). Η απομάκρυνση των αερίων έγινε τη νύχτα πριν τη χρωματογραφία, όταν χρησιμοποιήθησαν απορρυπαντικά, ώστε ο αφρός που προκαλείται να επανέρχεται στο διάλυμα. Η χρωματογραφική στήλη εδοκιμάσθη αρχικά με νερό ως κινητή φάση, τη νύχτα πριν από τη χρωματογραφία, για να βεβαιωθεί ότι η συσκευή λειτουργεί καλά. Ελήφθη πρόνοια ώστε η πίεση στη στήλη να μην υπερβή ποτέ το καθορισμένο όριο. Παράλληλα, έγινε σταδιακά αύξηση του ρυθμού ροής της κινητής φάσης. Το πρωτεϊνικό δείγμα υπεβλήθη σε φυγοκέντρηση ή διήθηση πριν φορτωθεί στη στήλη. Ο όγκος δείγματος που εφορτώθη στη στήλη ήταν κάθε φορά ο μικρότερος δυνατός. Ο ρυθμός εκροής της στήλης ήταν 0.3 έως 0.4 ml/min στους 4°C.

Τα χρωματογραφικά κλάσματα που συνελέχθησαν, αναλύθηκαν με διαφόρους μεθόδους προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των εκλουόμενων πρωτεϊνών. Τρεις τεχνικές που εχρησιμοποιήθησαν γι'αυτό το σκοπό είναι ο δείκτης διάθλασης (refractive index, RI), η διάχυση του φωτός (evaporative light scattering, ELS) και η φασματοσκοπία σε μήκη κύματος υπεριώδη (ultraviolet, UV). Στην παρούσα εργασία, τα δείγματα εξετάστηκαν με φασματοσκοπία στα 260nm και 280nm. Για τις πρώτες δοκιμές χρωματογραφίας με στήλη TSK, χρησιμοποιήθηκαν οι ανιχνευτές TDA (Triple Detector Array, http://www.viscotek.com/detectors). Η μέθοδος απαιτεί τα δείγματα που ενίονται να είναι συμπυκνωμένα. Για το λόγο αυτό, μετά τον καθαρισμό του mSR-BI-t1 με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας, τα αρχικά δείγματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό και τα οποία είχαν συγκέντρωση ~80 μg/ml, συμπυκνώθηκαν 20 περίπου φορές σε τελική συγκέντρωση 1-2mg/ml με τη χρήση φίλτρων Centricon YM-3 (όριο μοριακού ηθμού: 14kDa). Συγκεντρώσεις υψηλότερες από 2mg/ml, όχι μόνο δεν είναι απαραίτητες για τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, αλλά είναι επιπλέον και ανεπιθύμητες, καθώς μπορεί να προκαλέσουν ολιγομερισμό της πρωτεΐνης. Παρασκευή

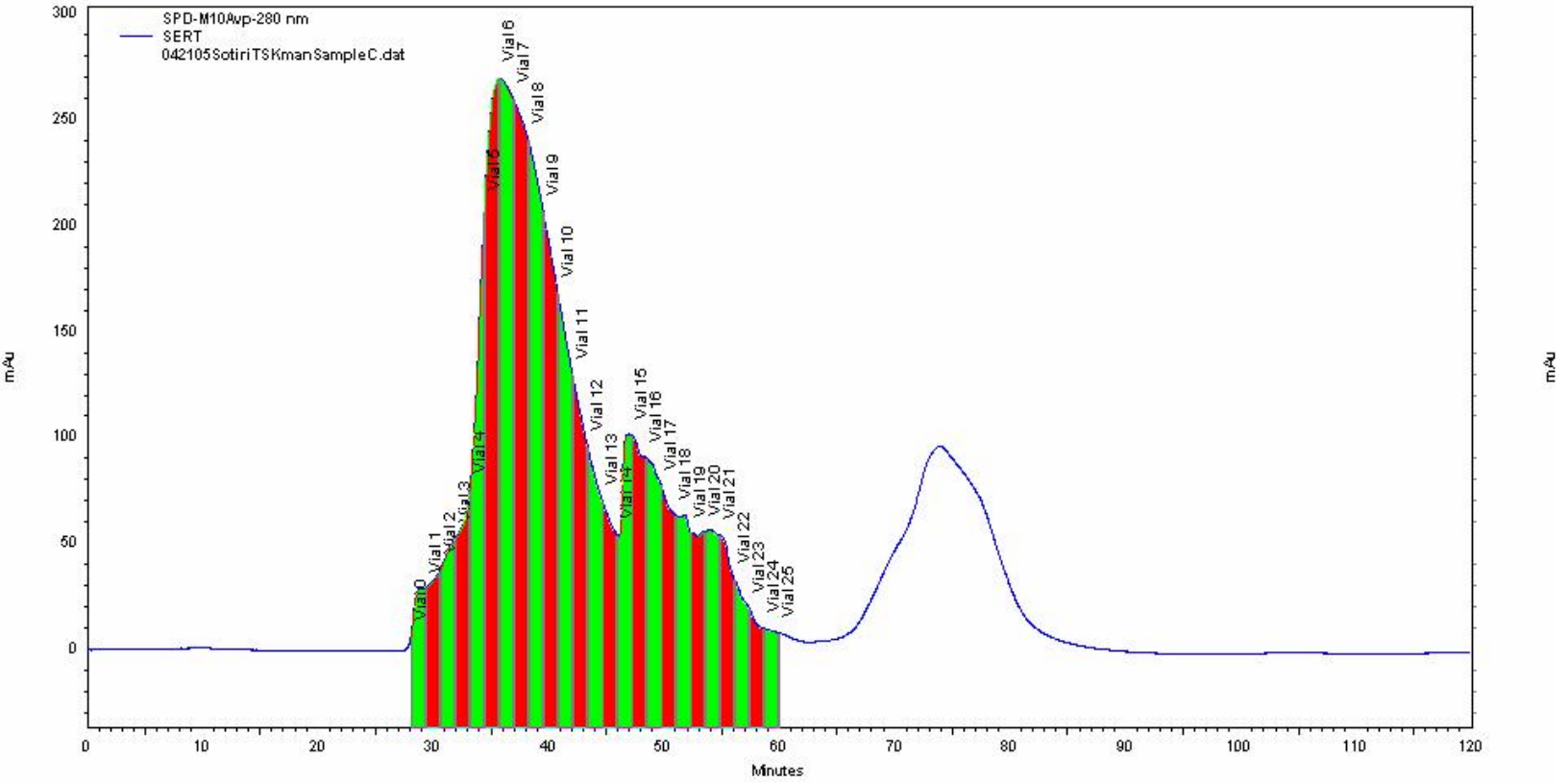
δείγματος χωρίς το πεπτίδιο έγινε διυλίζοντας το δείγμα μετά τη συμπύκνωσή του, χρησιμοποιώντας μεμβράνες διήθησης που κατακρατούν μόρια >12 kDa. Η απομάκρυνση του απορρυπαντικού είναι επιθυμητή, διότι όπως φάνηκε από τις δοκιμασίες κρυστάλλωσης που περιγράφονται πιο κάτω, η υψηλή συγκέντρωση απορρυπαντικού οδηγεί σε διαχωρισμό φάσης στις σταγόνες των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για κρυστάλλωση.

Οι χρωματογραφικές καμπύλες των αρχικών δειγμάτων καθαρής mSR-BI-t1 είχαν τη μορφή που φαίνεται στην Εικ.30. Οι πρώτες δύο κορυφές θεωρείται ότι αντιστοιχούν σε ολιγομερή του υποδοχέα ενώ η τρίτη κορυφή, που εκλούεται στα 16ml είναι τα μονομερή του mSR-BI-t1 που απορροφούν στο μήκος κύματος των 280 nm. Το υπόλοιπο της καμπύλης αντιστοιχεί σε συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος. Η κορυφή που αντιστοιχεί στα μονομερή του mSR-BI-t1 δεν είναι συμμετρική (Εικ.31). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση απορρυπαντικού στο δείγμα. Για να διαπιστωθεί εάν τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην τρίτη κορυφή του χρωματογραφήματος θα δώσουν την ίδια μορφολογία καμπύλης μετά από επαναχρωματογράφηση, το κλάσμα 8 της πρώτης στήλης (Εικ. 30) συμπυκνώθηκε και υπεβλήθη σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, η χρωματογραφία έδωσε συμμετρική κορυφή έκλουσης του SR-BI-t1. Επαναχρωματογράφηση των κλασμάτων 28-32 μετά από συμπύκνωση, έδωσε εκ νέου συμμετρική κορυφή έκλουσης (Εικ. 33). Τέλος, επαναχρωματογράφηση των υπόλοιπων κλασμάτων 4-12 (εκτός του F8) του δείγματος mSR-BI-t1 της Εικ. 31, έδωσε πάλι μονήρη κορυφή (Εικ. 34). Το συμπέρασμα που εξήχθη από τις ανωτέρω αναλύσεις είναι ότι ο mSR-BI-t1 μπορεί να απομονωθεί σε καθαρή μορφή και ότι ο υποδοχέας είναι σταθερός στο απορρυπαντικό octyl glucoside και έχει καλές προοπτικές κρυστάλλωσης. Πριν την έναρξη των δοκιμών κρυστάλλωσης, προσδιορίστηκε χρωματογραφικά η επίδραση παραγόντων όπως το pH και η προσθήκη DTT στην ποιότητα των δειγμάτων του mSR-BI-t1.

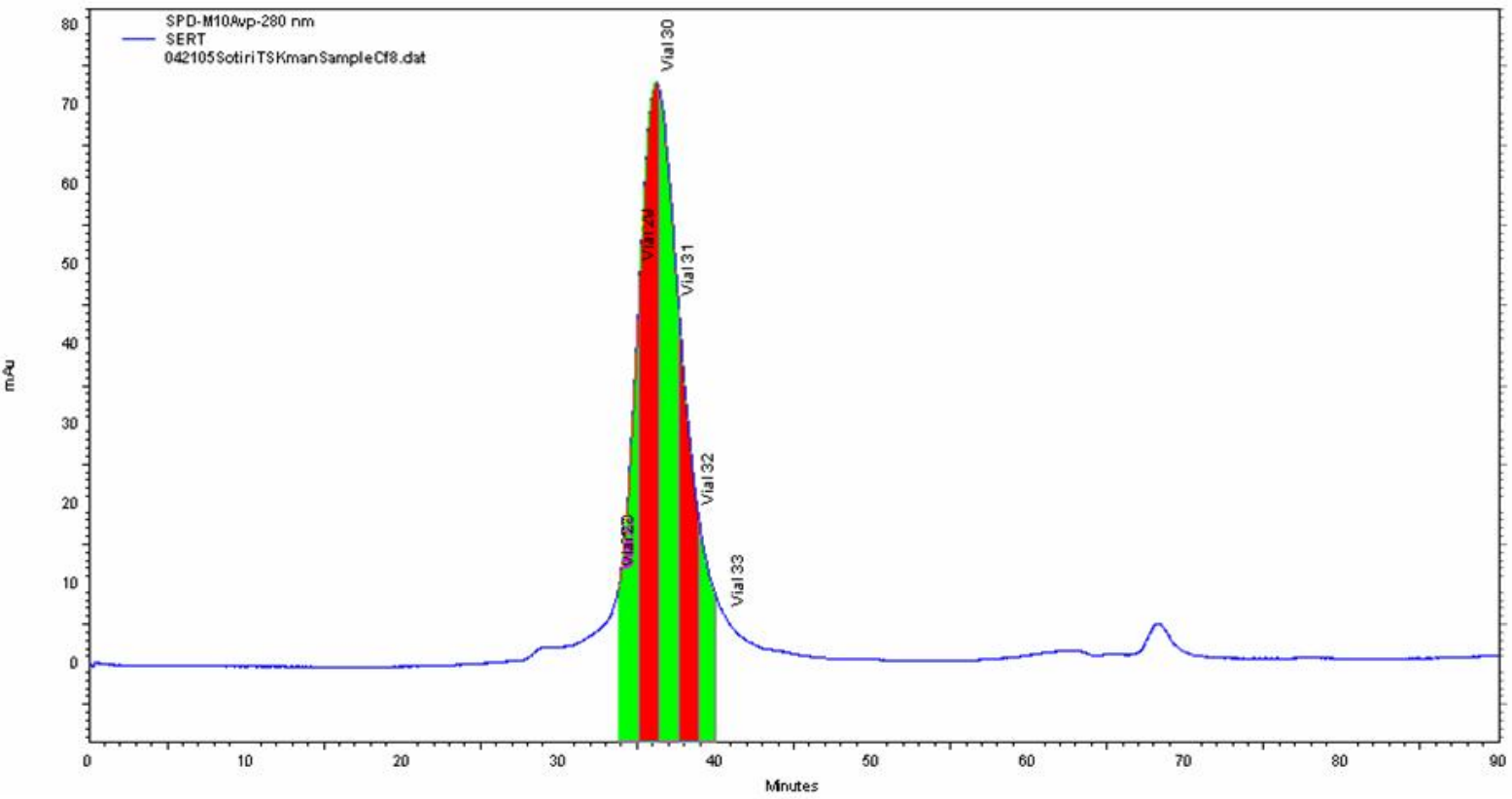
- Η Επίδραση του DTT στην Ποιότητα των Δειγμάτων mSR-BI-t1



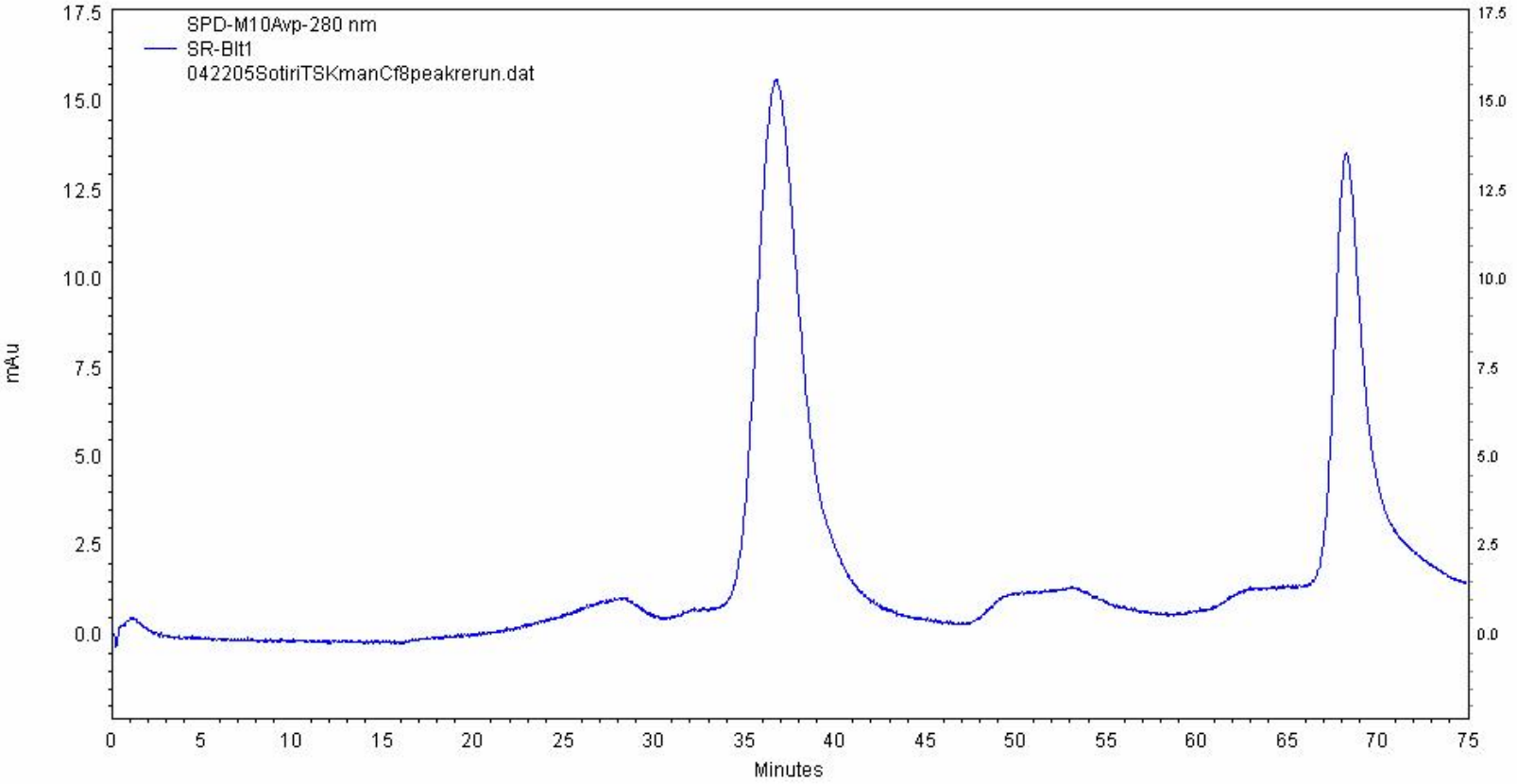
Εικ. 30. Χρωματογράφημα του Αρχικού Δείγματος mSR-BI-t1 που Απομονώθηκε με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας, Όπου Αναγνωρίζονται 3 Κύριες Κορυφές. Για τη Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Χρησιμοποιήθηκε Στήλη TSK 60cm και Κινητή Φάση 40mM OG, 100mM NaCl, 20mM Hepes, pH 7.2, Χωρίς DTT. Το Σήμα Ανιχνεύθηκε στα 280nm.



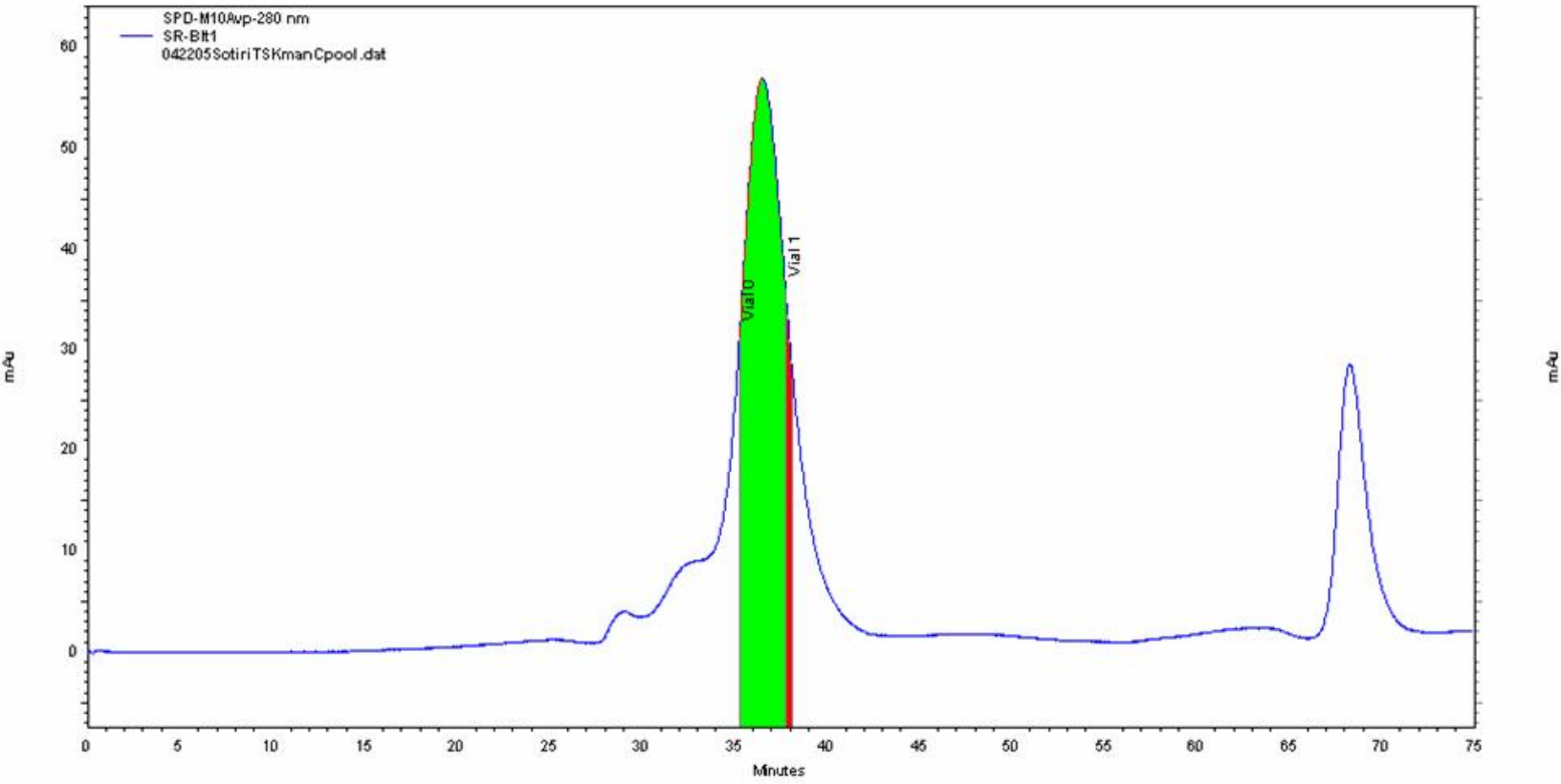
Εικ. 31. Χρωματογράφημα Αρχικού Δείγματος mSR-BI-t1 που Απομονώθηκε με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας, Όπου Αναγνωρίζονται 3 Κύριες Κορυφές. Για τη Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Χρησιμοποιήθηκε Στήλη TSK 60cm και Κινητή Φάση 40mM OG, 100mM NaCl, 20mM Hepes, pH 7.2, με 2mM DTT. Το Σήμα Ανιχνεύθηκε στα 280nm.



Εικ 32. Χρωματογράφημα του Κλάσματος 8 του Δείγματος mSR-BI-t1 της Εικ.31, το Οποίο Παρουσιάζει Μονήρη Κορυφή. Για τη Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Χρησιμοποιήθηκε Στήλη TSK 60cm και Κινητή Φάση 40mM OG, 100mM NaCl, 20mM Hepes, pH 7.2 και 2mM DTT. Το Σήμα Ανιχνεύθηκε στα 280nm.



Εικ. 33. Χρωματογράφημα των Κλασμάτων 28-32 του Δείγματος SR-BI της Εικ.32, το Οποίο Παρουσιάζει Μονήρη Κορυφή. Για τη Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Χρησιμοποιήθηκε Στήλη TSK 60cm και Κινητή Φάση 40mM OG, 100mM NaCl, 20mM Hepes, pH 7.2 και 2mM DTT. Το Σήμα Ανιχνεύθηκε στα 280nm.

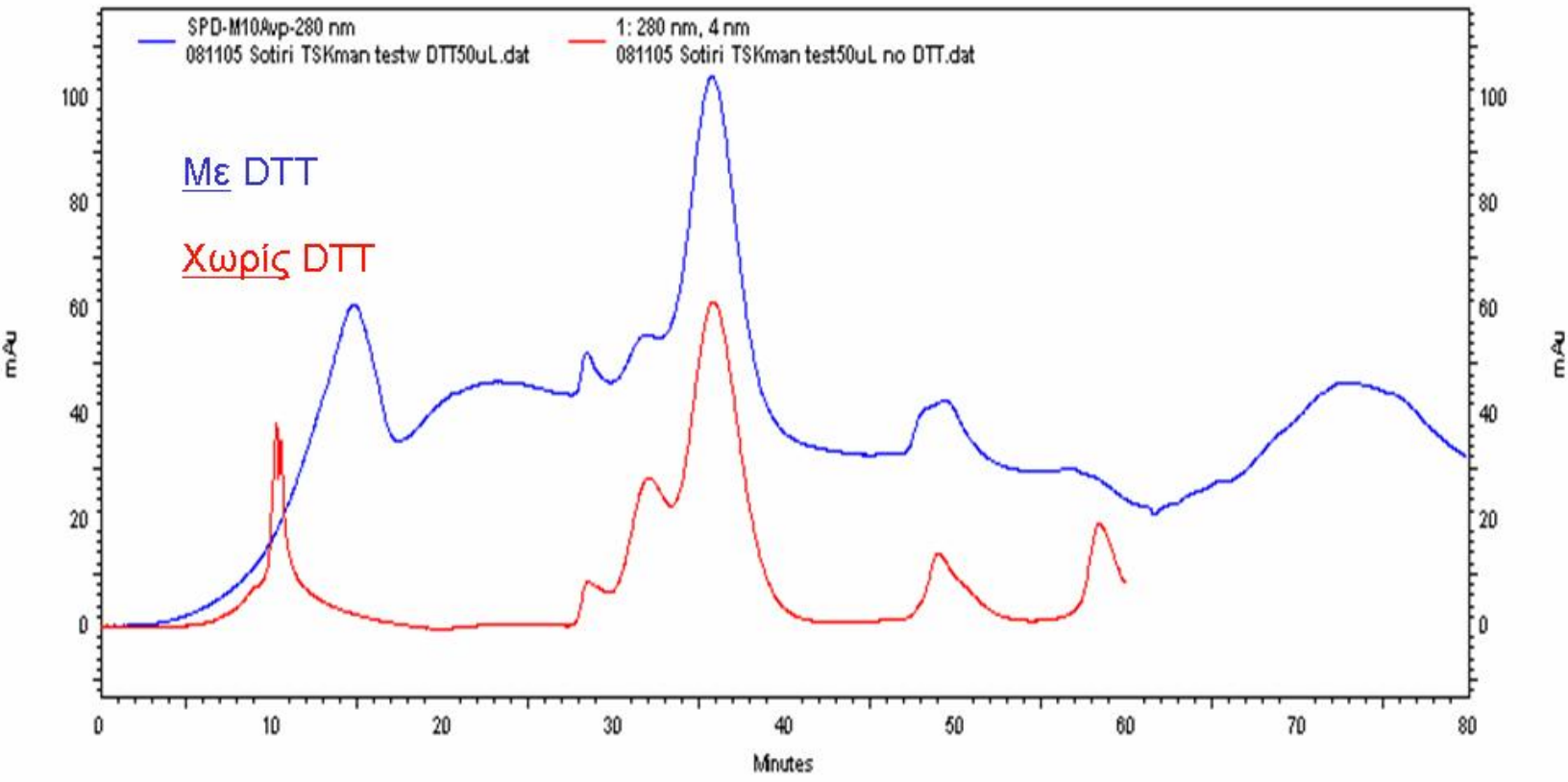


Εικ. 34. Χρωματογράφημα των Κλασμάτων 4-12 (εκτός του F8) του Δείγματος mSR-BI-t1 της Εικ.31, το Οποίο Παρουσιάζει Μονήρη Κορυφή. Για τη Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Χρησιμοποιήθηκε Στήλη TSK 60cm και Κινητή Φάση 40mM OG, 100mM NaCl, 20mM Hepes, pH 7.2 και 2mM DTT. Το Σήμα Ανιχνεύθηκε στα 280nm.

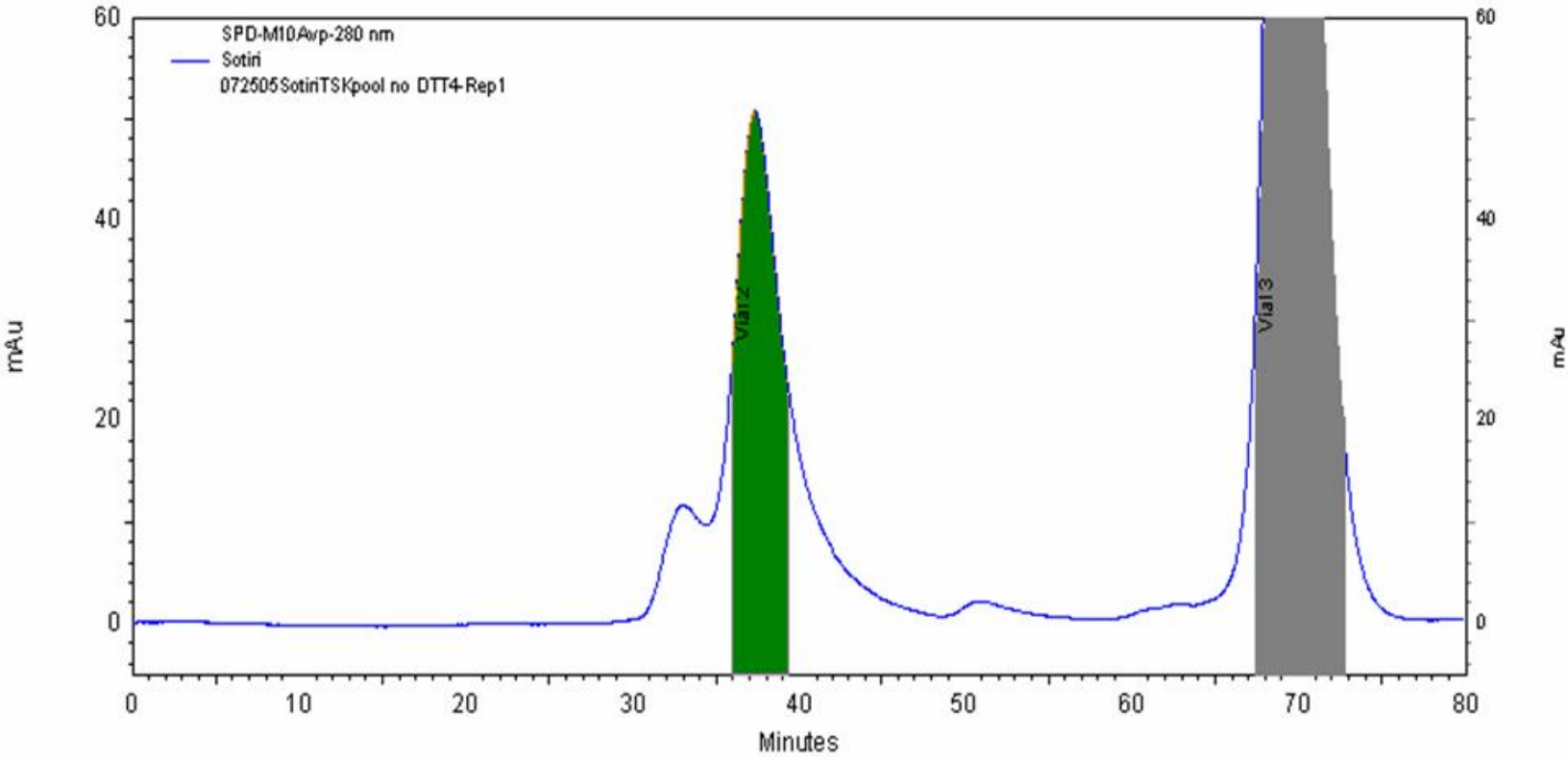
Το DTT (διθειοθρεϊτόλη), που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, δεν χρησιμοποιήθηκε κατά τον καθαρισμό του mSR-BI-t1 με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας. Στη μεγάλη πλειοψηφία των αναλύσεων με χρωματογραφία μοριακής διήθησης όπου προσετέθησαν 2mM DTT, παρατηρήθηκε μετατόπιση, μερικώς, του κλάσματος των ολιγομερών στο κλάσμα των μονομερών του mSR-BI-t1 (Εικ.35 και σύγκριση Εικ. 30 και 31). Παρά τη επίδραση του DTT στην αναλογία των διαφορετικών πληθυσμών του mSR-BI-t1, μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, το DTT δεν φαίνεται να απαιτείται για τη σταθερότητα του υποδοχέα (Εικ.36, Εικ.37). Από τα πειράματά μας προκύπτει ότι είναι μάλλον καλό να χρησιμοποιείται το DTT σε συγκέντρωση 2mM στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης και τη χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας.

- Η Επίδραση του pH στην Ποιότητα των Δειγμάτων mSR-BI-t1

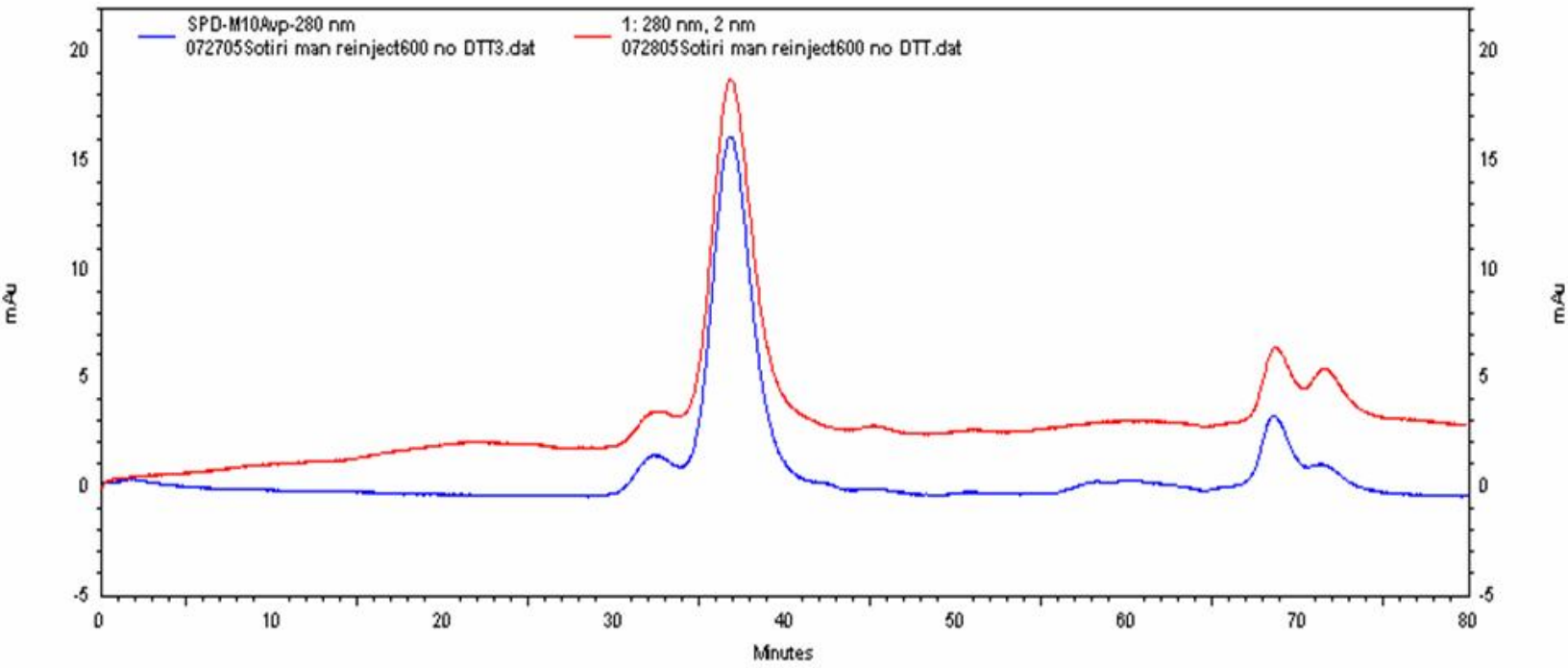
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του pH στα δείγματα του mSR-BI-t1 σε συνάρτηση και με το χρόνο, πραγματοποιήθηκε διάλυση των δειγμάτων της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης έναντι διαλυμάτων με διαφορετικό pH. Έτσι δείχθηκε ότι, mSR-BI-t1 που απεμονώθη με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας σε pH 6 (MES) είναι σταθερός μετά από 10 (Εικ.38) και 17 (Εικ.39) ημέρες σε pH 6. Επίσης, μετά από αρχική χρωμτογραφία σε pH 7.2 με χρήση στήλης TSK η καμπύλη έκλουσης του mSR-BI-t1 σημείωσε μικρή μετατόπιση προς την κορυφή των ολιγομερών μετά από 85 ημέρες παραμονής σε pH 7.2 (Εικ.40). Επίσης, mSR-BI-t1 που εκαθαρίσθη με χρήση χρωματογραφίας ανοσοσυγγενείας σε pH 7.2 (Hepes, χωρίς DTT) είναι σταθερός μετά από χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε pH 6 (Εικ.41), pH 7 (Εικ.42), pH 7.2 (Εικ.43) και pH 8 (Εικ.44) μετά από 35 ημέρες φύλαξής του στα εν λόγω pH. Η ισορροπία μεταξύ του πληθυσμού των ολιγομερών και των μονομερών σε pH 7.2 μετατοπίσθη προς τα ολιγομερή μεταξύ των ημερών 6 και 18 και δεν μετεβλήθη περαιτέρω μεταξύ των ημερών 18 και 27 (Εικ.45). Τέλος, αύξηση στην τιμή pH της κινητής φάσης κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση του ολιγομερισμού του υποδοχέα (Εικ.46).



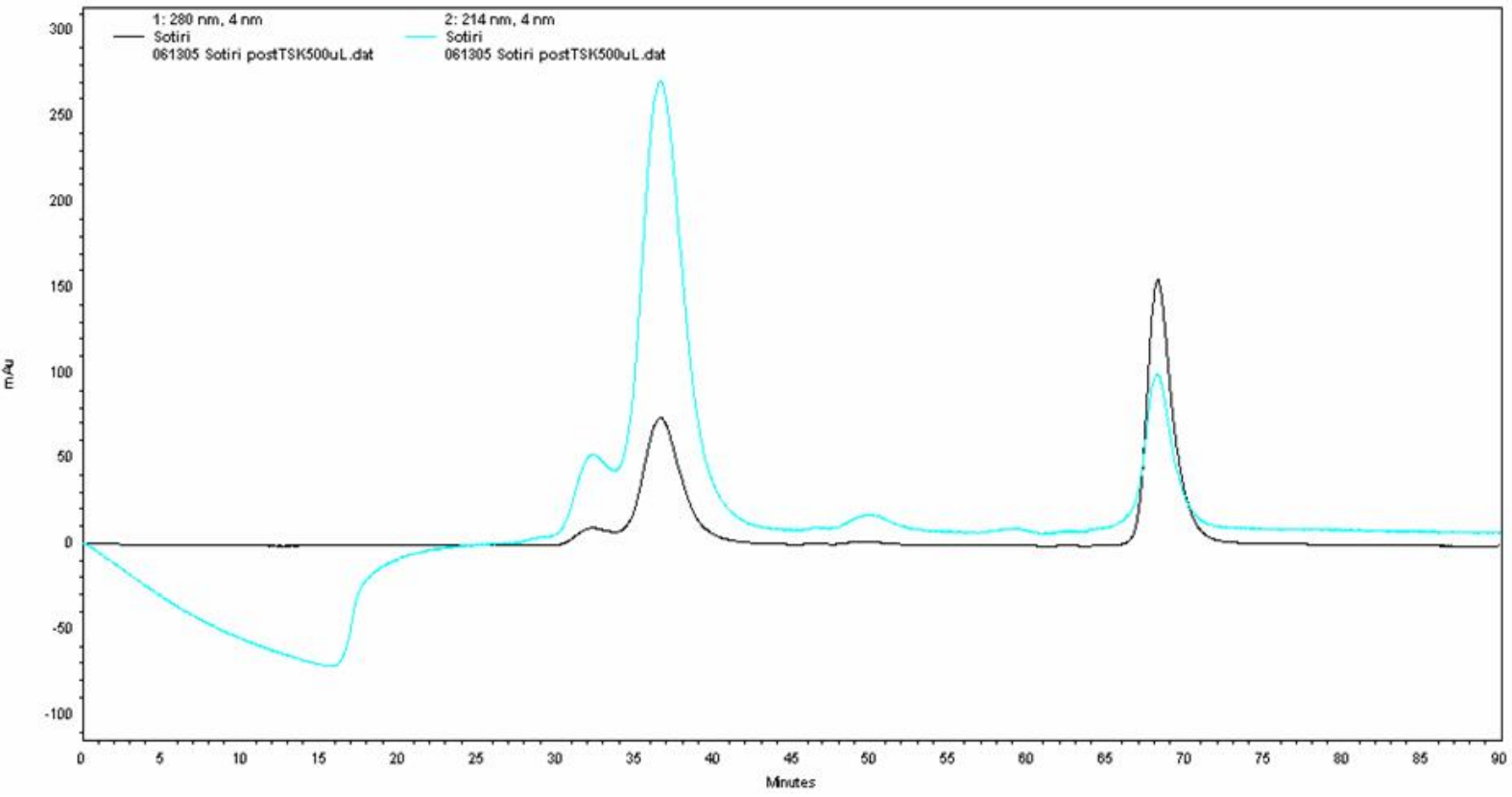
Εικ. 35. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Δείγματος mSR-BI-t1 Με και Χωρίς Προσθήκη 2mM DTT στην Κινητή Φάση – Η Παρουσία του DTT Μειώνει τον Πληθυσμό των Ολιγομερών.



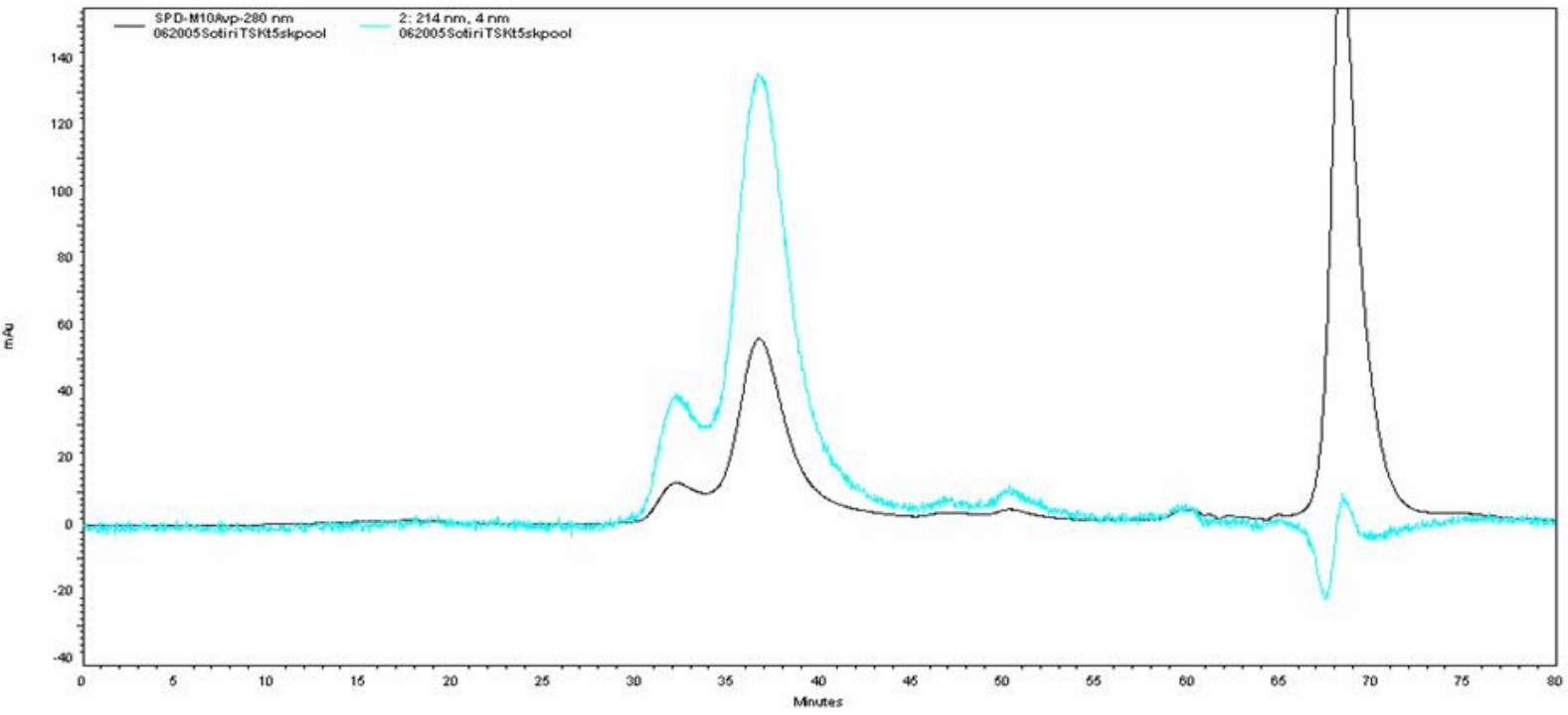
Εικ. 36. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Δείγματος mSR-BI-t1 για Αφαίρεση του DTT – Απόντος του DTT τα Δείγματα Παραμένουν Σταθερά



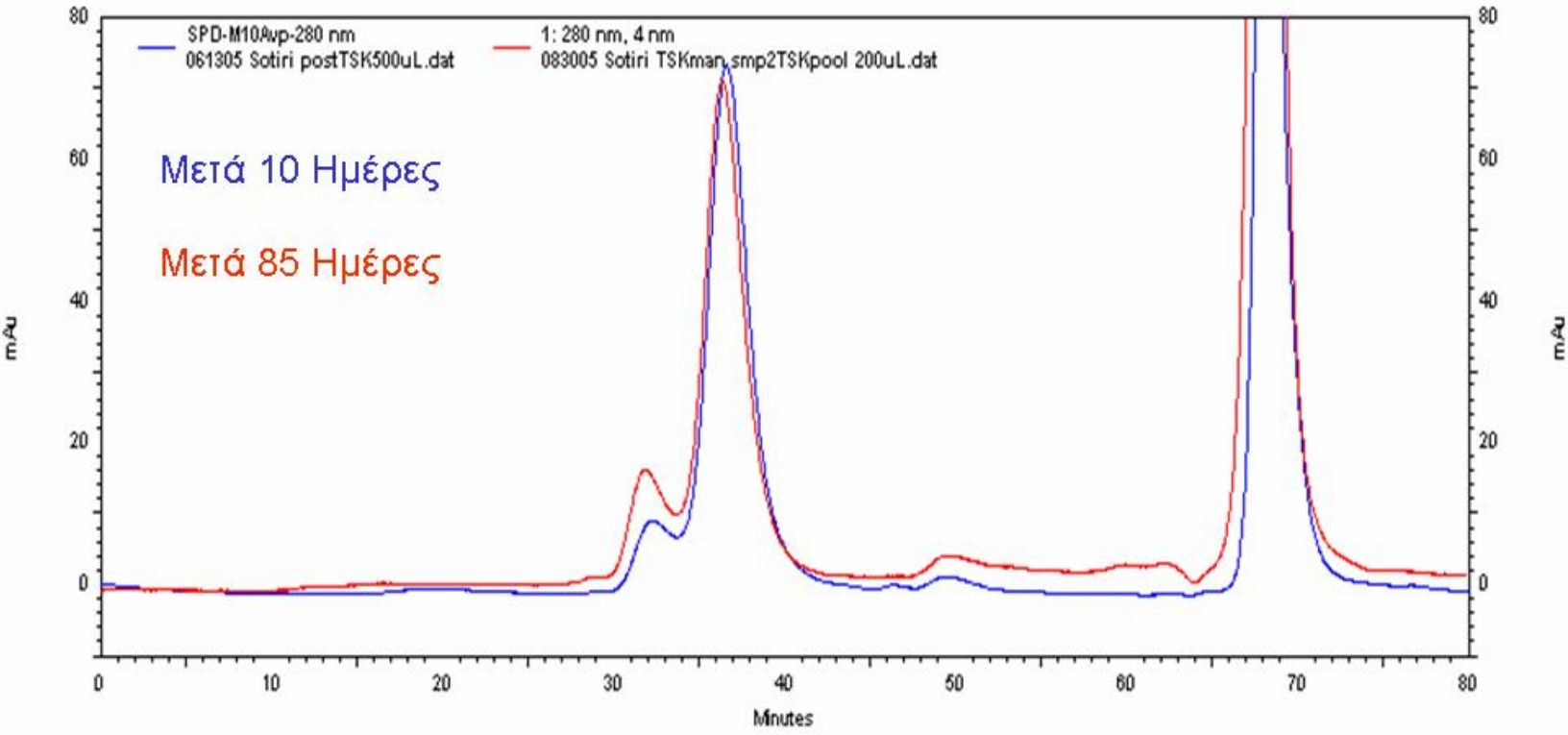
Εικ. 37. Νέα Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους του Δείγματος της Εικ.36 Μετά Από 3 Ημέρες όπου Φαίνεται ότι η Απουσία του DTT από το Δείγμα του mSR-BI-t1 Δεν Μεταβάλλει την Αναλογία Ολιγομερών/Μονομερούς Υποδοχέα



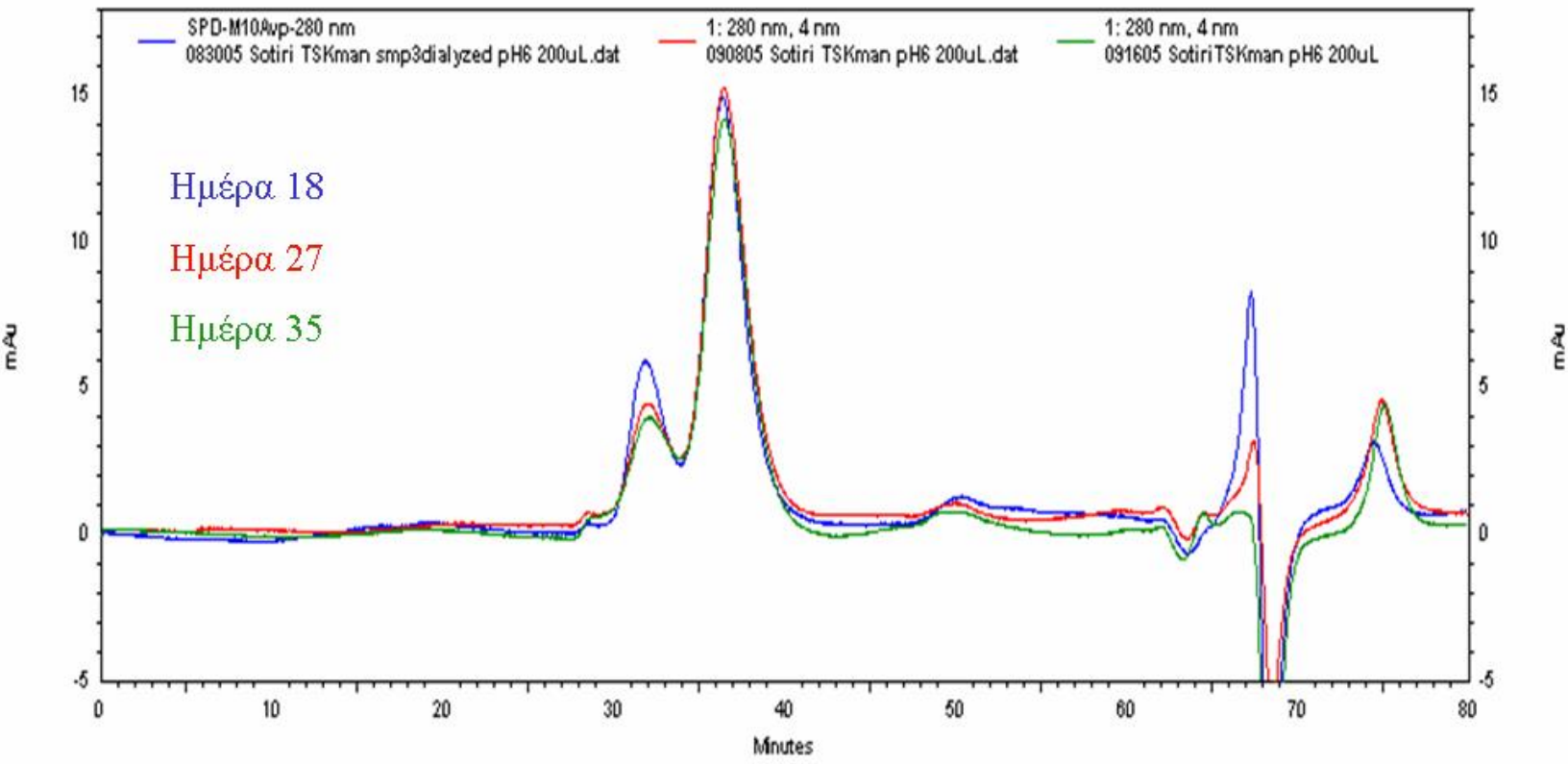
Εικ. 38. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε pH 7.2 με Στήλη TSK, Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε pH 6 (MES), **10** Ημέρες Μετά την Αρχική Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε pH 7.2 .



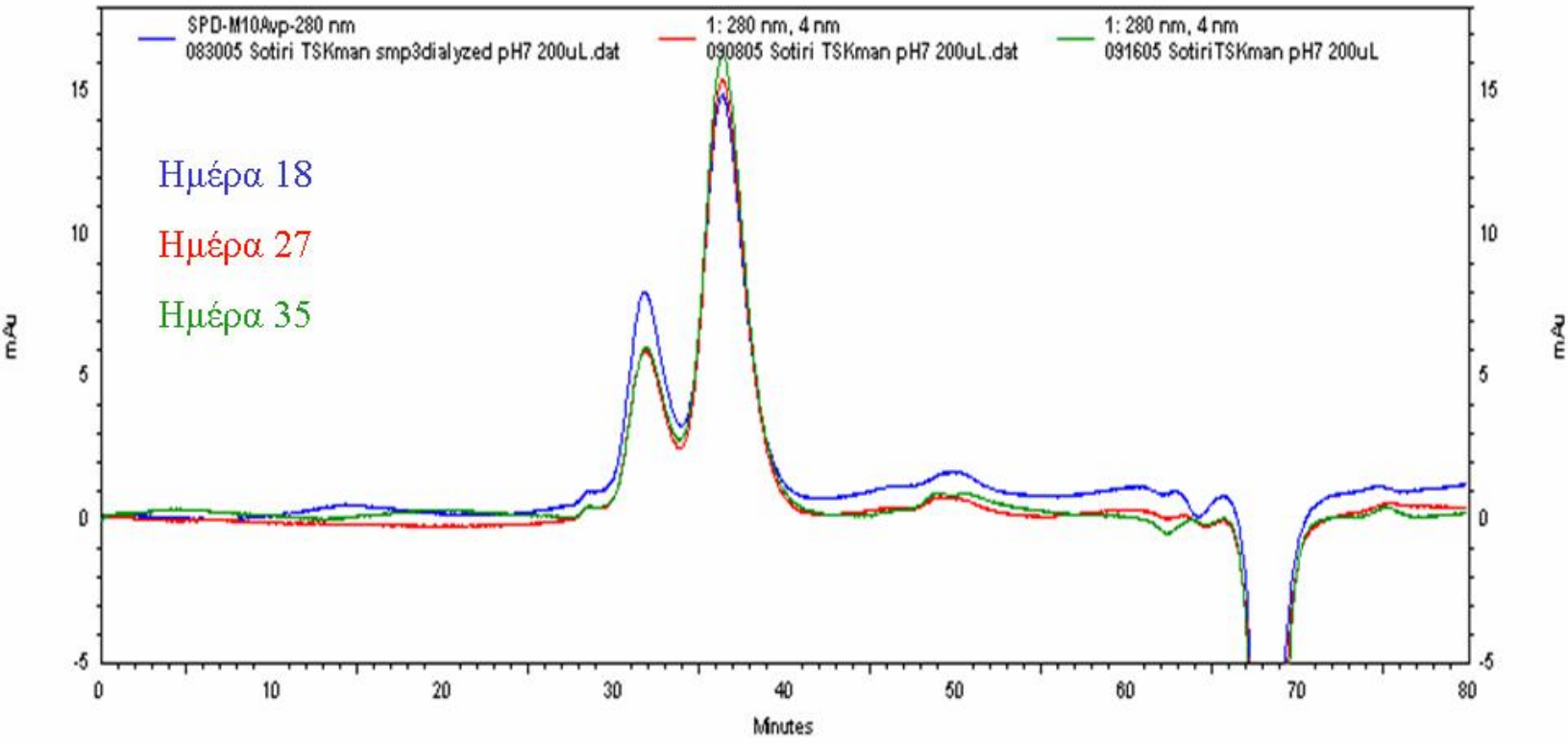
Εικ. 39. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε pH 7.2 με Στήλη TSK, Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε pH 6 (MES), 17 Ημέρες Μετά την Αρχική Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε pH 7.2 .



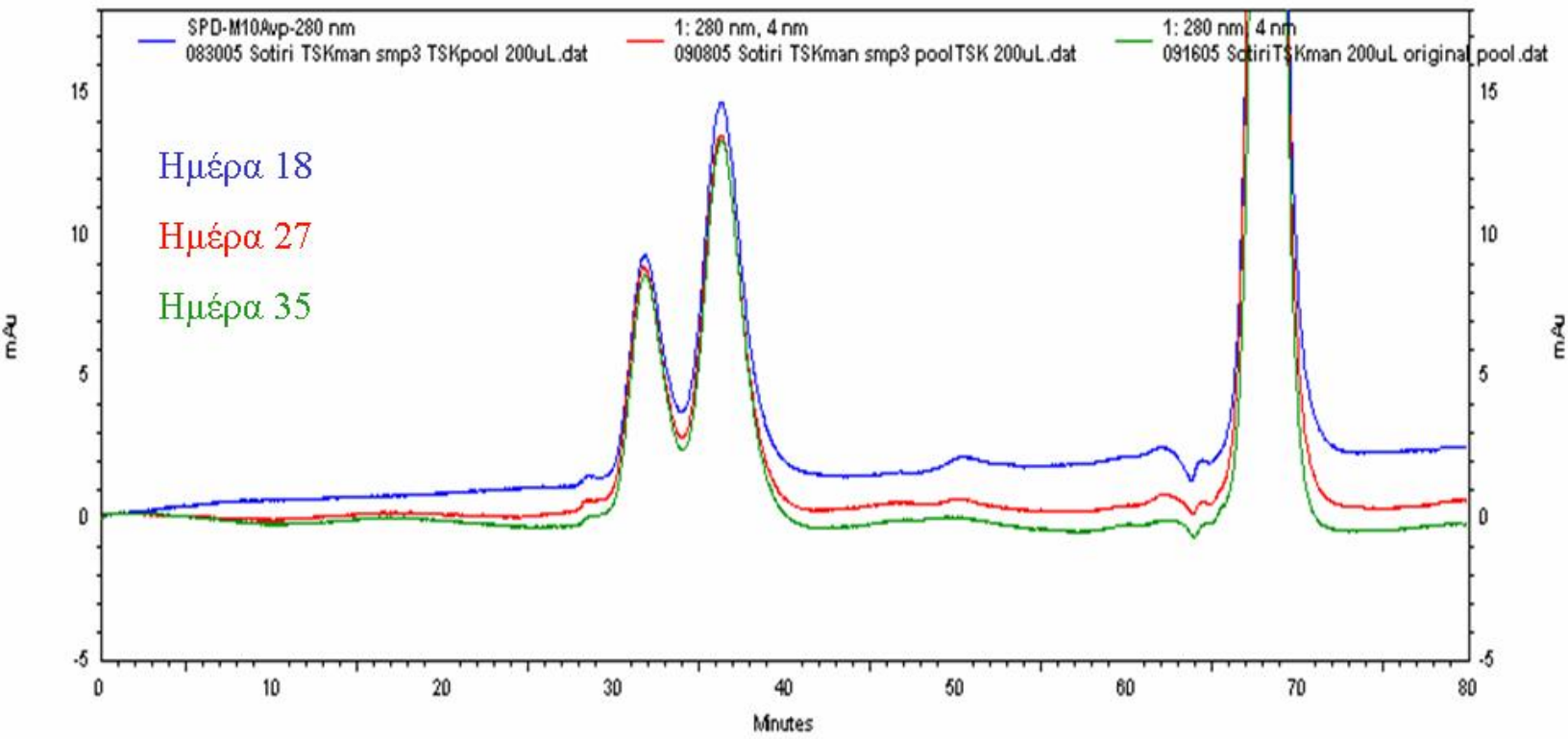
Εικ. 40. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε pH 7.2, Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε pH 6 (MES), 10 και 85 Ημέρες μετά την Παραγωγή του. Περίπου 15% της Πρωτεΐνης Ολιγομερίζεται στις 85 Ημέρες.



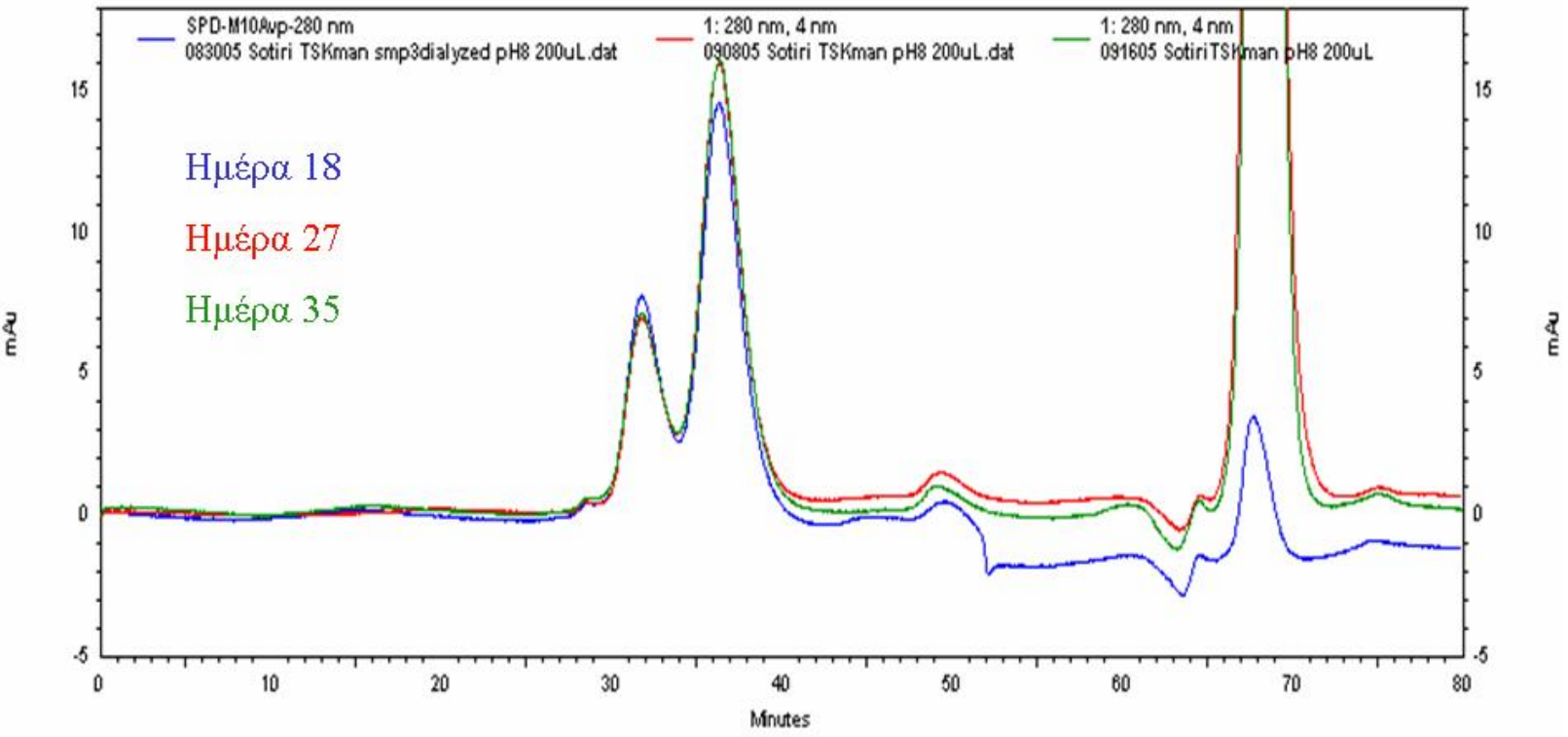
Εικ. 41. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους με Στήλη TSK σε **pH 6** (MES), Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε pH 7.2, 18, 27 και 35 Ημέρες μετά την Παραγωγή του.



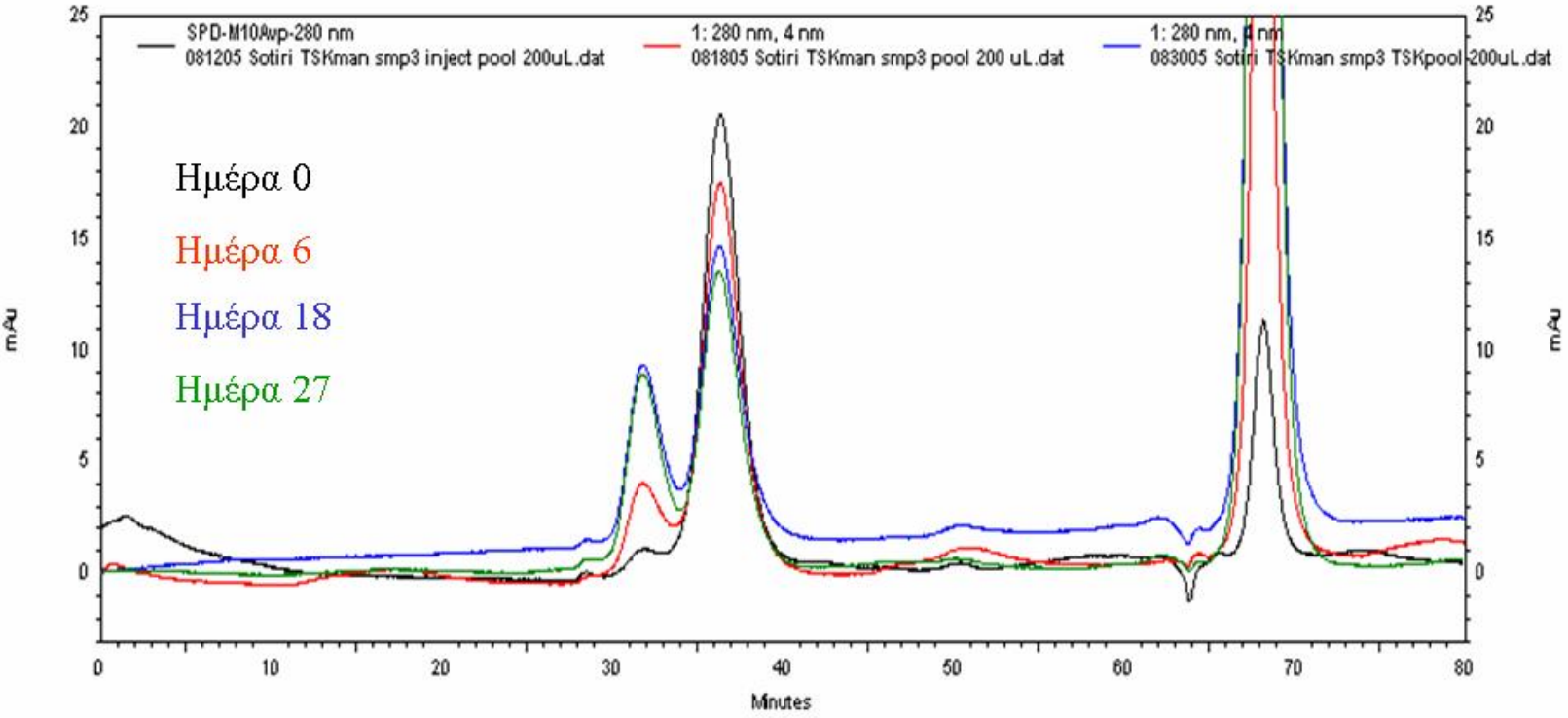
Εικ. 42. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους με Στήλη TSK σε **pH** 7 (Hepes), Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε pH 7.2, 18, 27 και 35 Ημέρες μετά την Παραγωγή του.



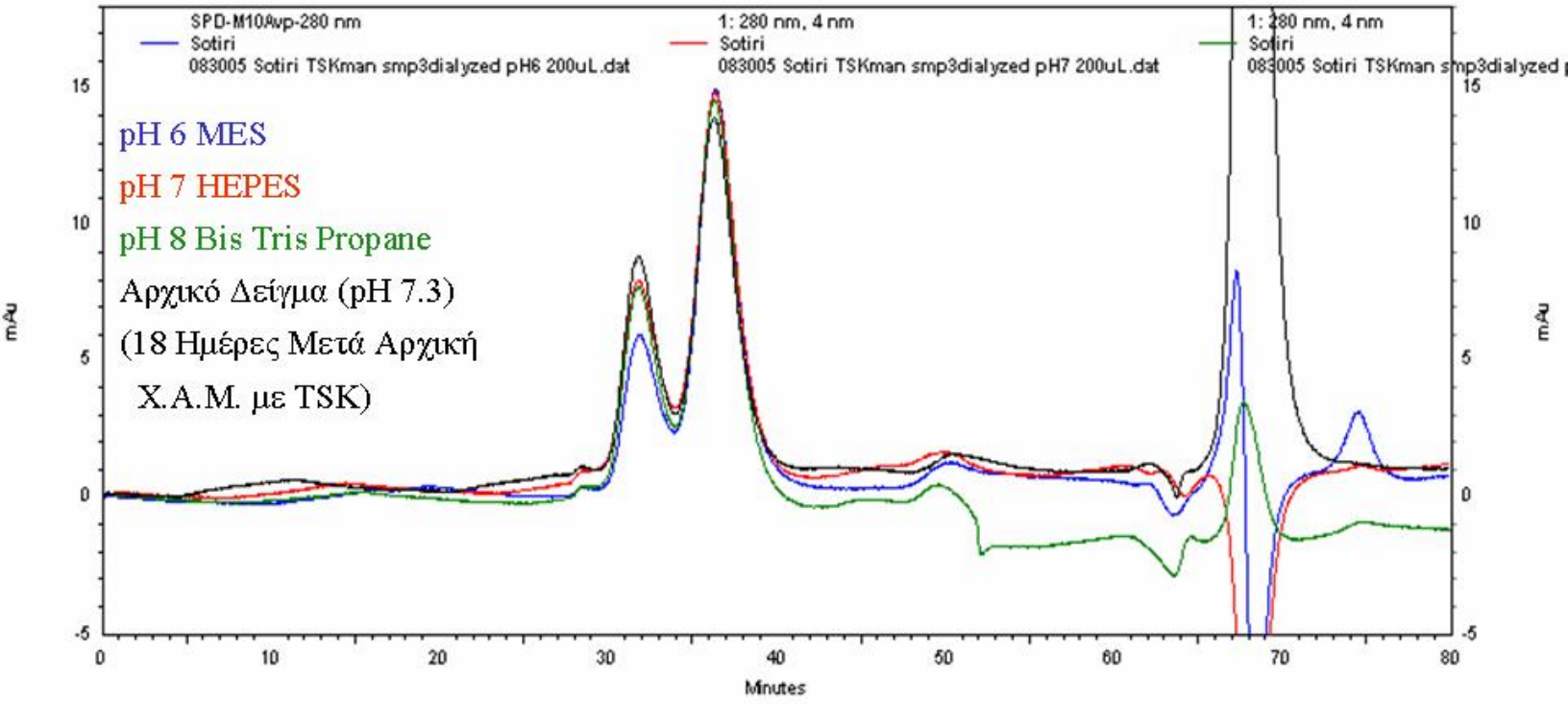
Εικ. 43. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους με Στήλη TSK σε **pH 7.2** (Hepes), Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε pH 7.2, 18, 27 και 35 Ημέρες μετά την Παραγωγή του.



Εικ. 44. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους με Στήλη TSK σε **pH 8** (Tris Bis Propane), Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε pH 7.2, 18, 27 και 35 Ημέρες μετά την Παραγωγή του.



Εικ. 45. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε pH 7.2, Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας επίσης σε pH 7.2, στις 0, 6, 18 και 27 Ημέρες Μετά την Παραγωγή του. Περίπου 40% του Υποδοχέα Ολιγομερίζεται Ως τη Μέρα 18. Πάντως, η Διαδικασία του Ολιγομερισμού Ισορροπεί Μεταξύ των Ημερών 6 και 18.



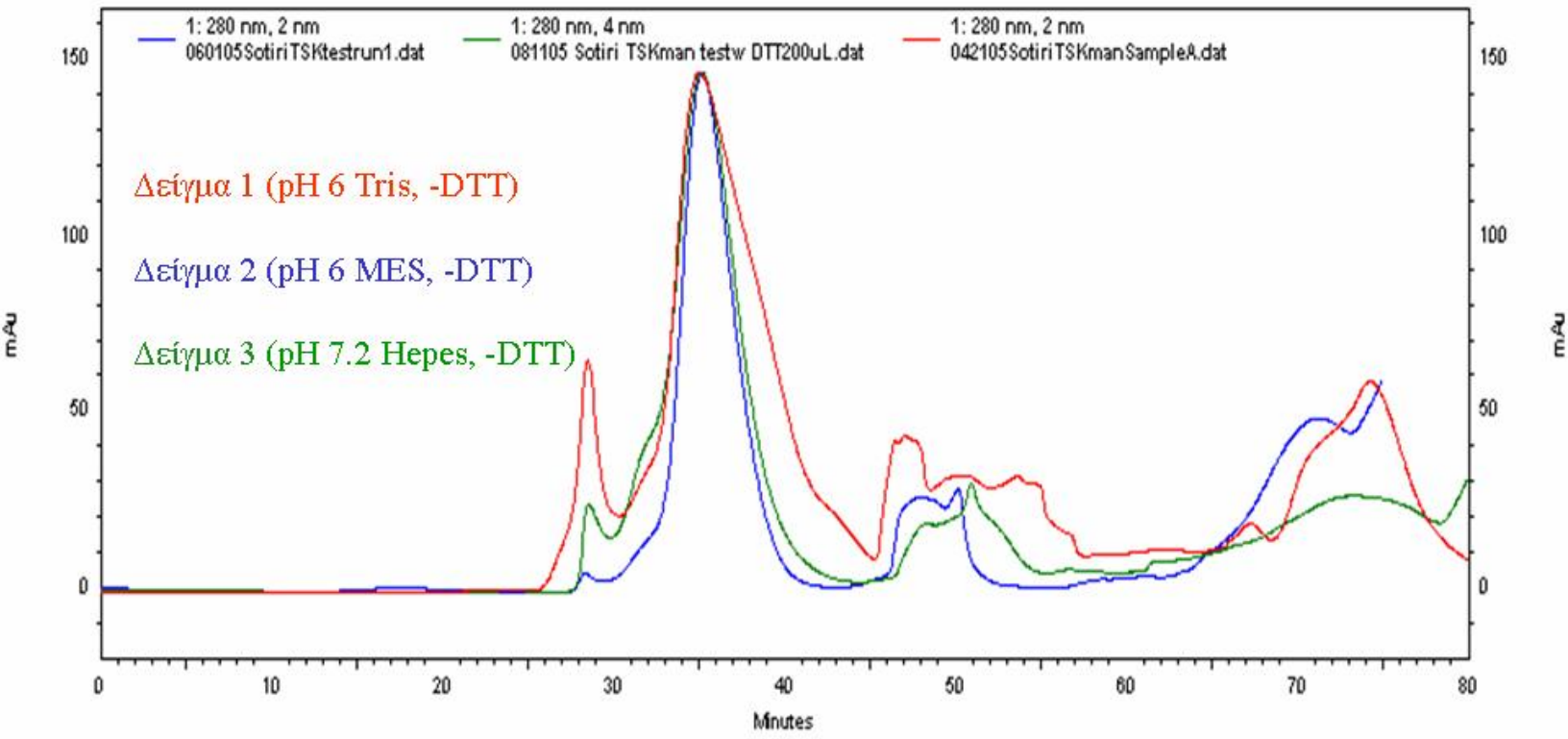
Εικ. 46. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε Διαφορετικές Τιμές pH, Δείγματος mSR-BI-t1 Παρηγμένου σε pH 7.3 (Hepes). Ως Κινητή Φάση Χρησιμοποιήθηκε Διάλυμα 100 mM NaCl, 40 mM OG, 2 mM DTT, 20% Γλυκερόλη και 20mM του Ενδεικνυόμενου Ρυθμιστικού Διαλύματος - Αύξηση του pH Φαίνεται να Αυξάνει τον Ολιγομερισμό του Υποδοχέα.

Η επίδραση του pH στην ισορροπία μεταξύ μονομερών και ολιγομερών εξαρτάται επίσης από την ποιότητα κάθε δείγματος. Η ποιότητα του δείγματος επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ηλικία, τη θερμοκρασία στην οποία έχει εκτεθεί, οι συνθήκες παραγωγής του. Αυτό φαίνεται π.χ. στην Εικ.47, όπου διαφορετικά δείγματα mSR-BI-t1 που παρήχθησαν στην ίδια τιμή pH (6.0) αλλά σε άλλο ρυθμιστικό διάλυμα και σε διαφορετικό χρόνο, παρουσιάζουν δραματικά διαφορετικά ποσοστά ολιγομερισμού. Προκειμένου να εκτιμηθεί ακριβέστερα ο ρόλος του pH στην ισορροπία μεταξύ ολιγομερών και μονομερών του SR-BI-t1, θα πρέπει σε μελλοντικά πειράματα το pH να παραμένει σταθερό καθ'όλη τη διαδικασία παραγωγής και καθαρισμού με χρήση χρωματογραφίας ανοσοσυγγενείας και χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

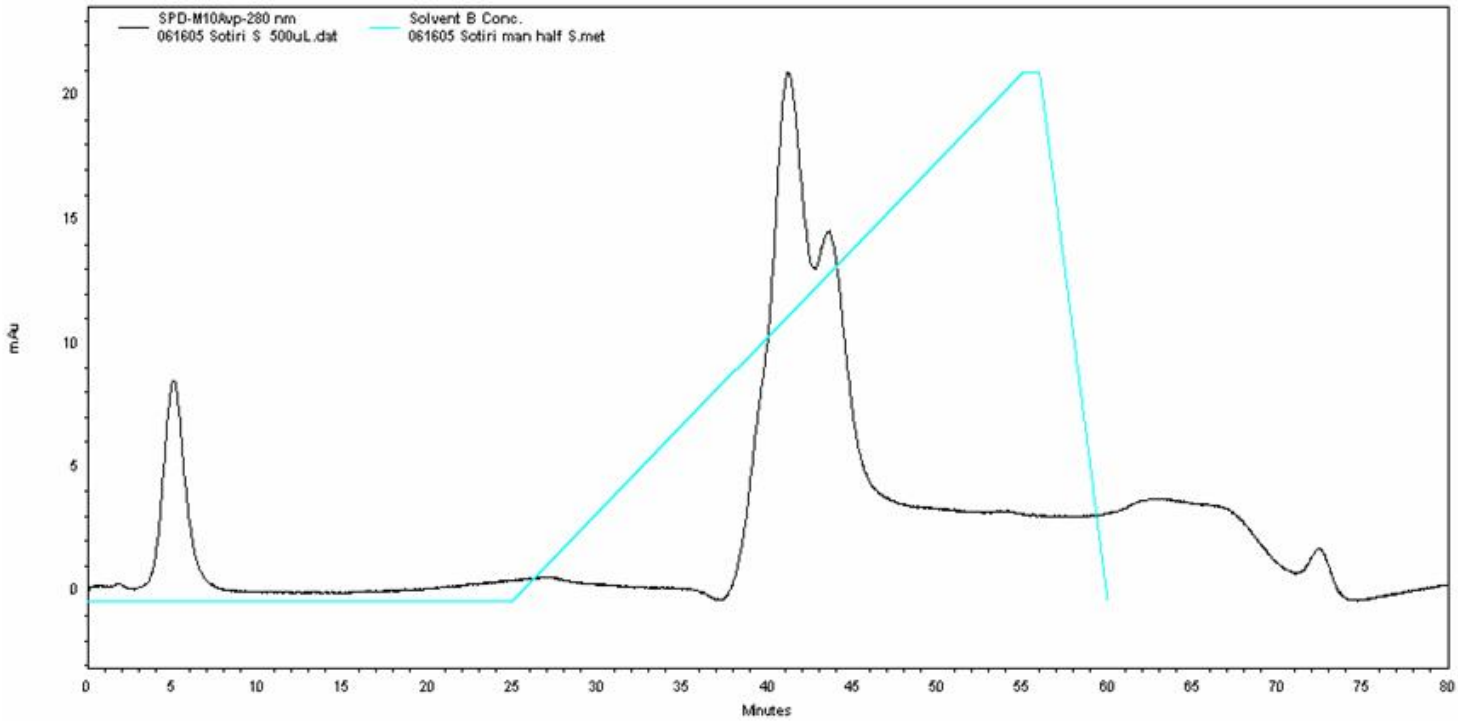
- Ανάλυση των Δειγμάτων mSR-BI-t1 με Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

Ο ρόλος του pH διερευνήθηκε περαιτέρω με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής που επιτρέπει το διαχωρισμό πρωτεϊνών βάσει του συνολικού φορτίου τους. Η επιφάνεια της στατικής φάσης έχει λειτουργικές ιοντικές ομάδες που αλληλεπιδρούν με ιόντα του δείγματος που έχουν αντίθετο φορτίο.

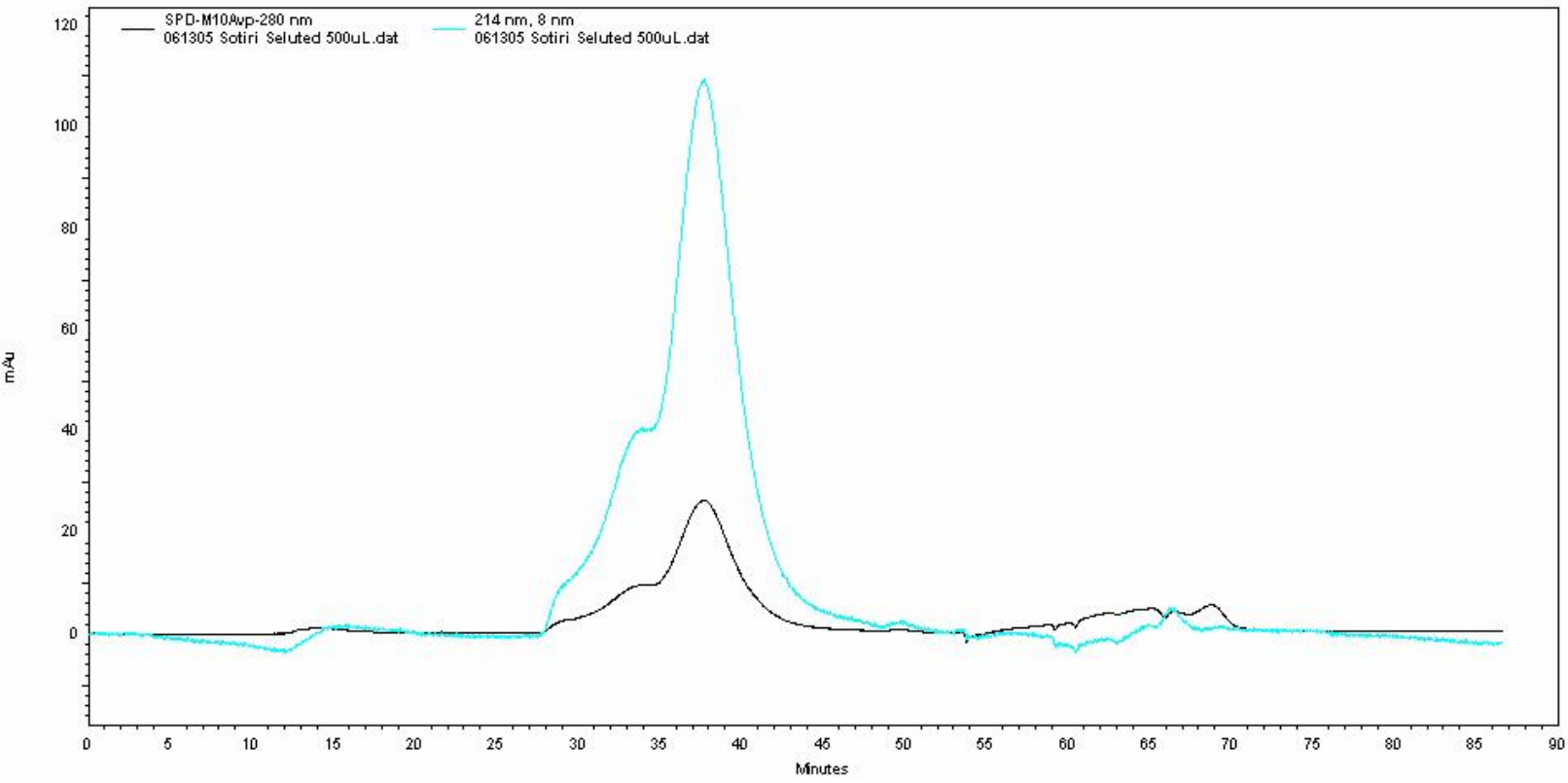
Τα πειράματα χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής έδειξαν ότι ο mSR-BI-t1 μπορεί να προσδεθεί σε στήλη χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής (DEAE) και να εκλουθεί με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης (πρηνούς) NaCl στο διάλυμα, σε pH 6 (Εικ.48). Χρωματογραφικός διαχωρισμός με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, του κλάσματος SR-BI που απεμονώθη με χρήση στήλης ανιοντοανταλλαγής έδειξε ότι το δείγμα περιέχει αυξημένο πληθυσμό ολιγομερών (Εικ.49). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην τιμή του pH ή/και στην υψηλή συγκέντρωση NaCl που χρησιμοποιείται για την έκλουση της πρωτεΐνης. Έγιναν περαιτέρω προσπάθειες βελτιστοποίησης της χρωματογραφίας σε pH 6 με χρήση διαφόρων πρηνών συγκέντρωσης NaCl, με τα ίδια αποτελέσματα (Εικ.50, Εικ.51, Εικ.52). Η αφαλάτωση του δείγματος σε pH 6 και μετά από διάλυση έναντι 10mM διαλύματος NaCl, είχε το ίδιο αποτέλεσμα (Εικ.53). Συμπερασματικά, η χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής (DEAE) σε pH 6 ή/και σε ακραίες τιμές



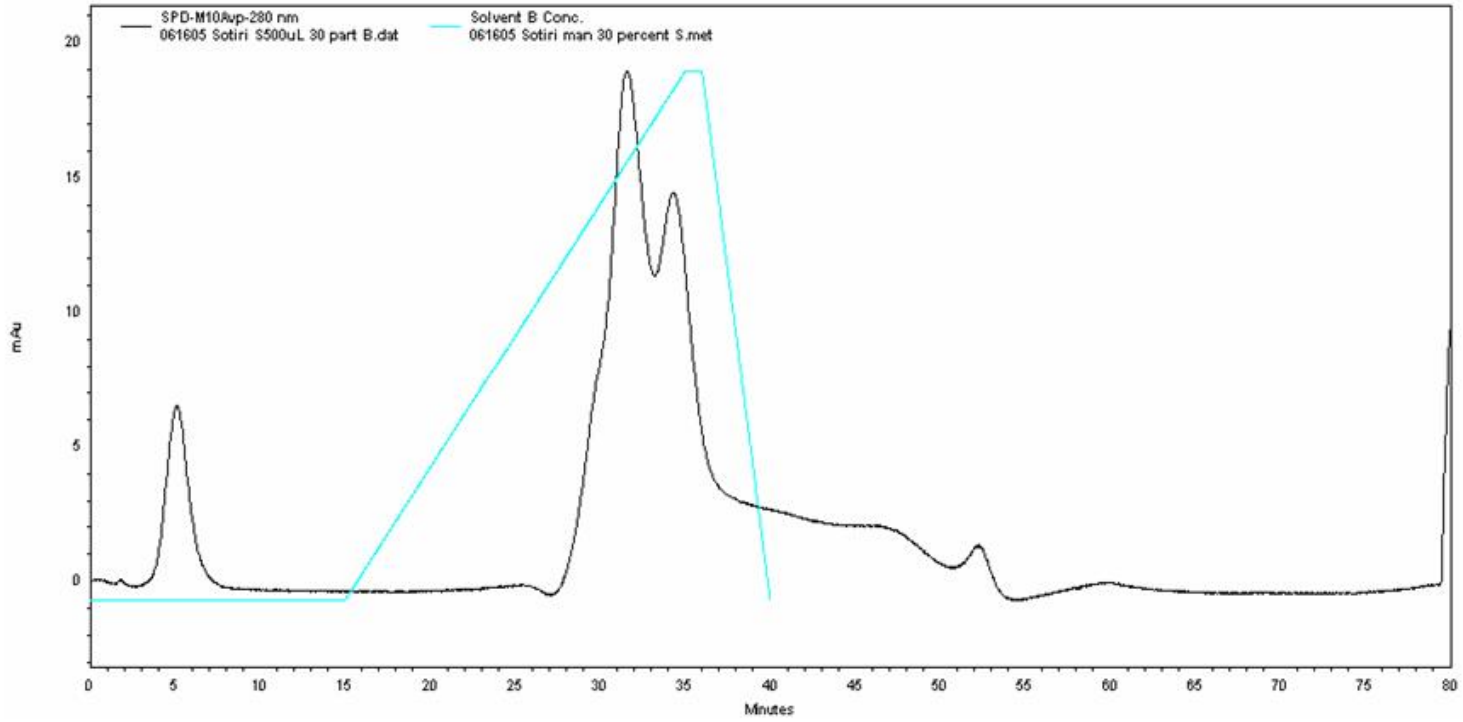
Εικ. 47. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους Δειγμάτων mSR-BI-t1 Παρηγμένων με Χρωματογραφία Ανοσοσυγγενείας σε Διαφορετικές Συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκε Στήλη TSK και Κινητή Φάση 20 mM Hepes pH 7.2, 100 mM NaCl, 40 mM OG, 20% Γλυκερόλη και 2 mM DTT.



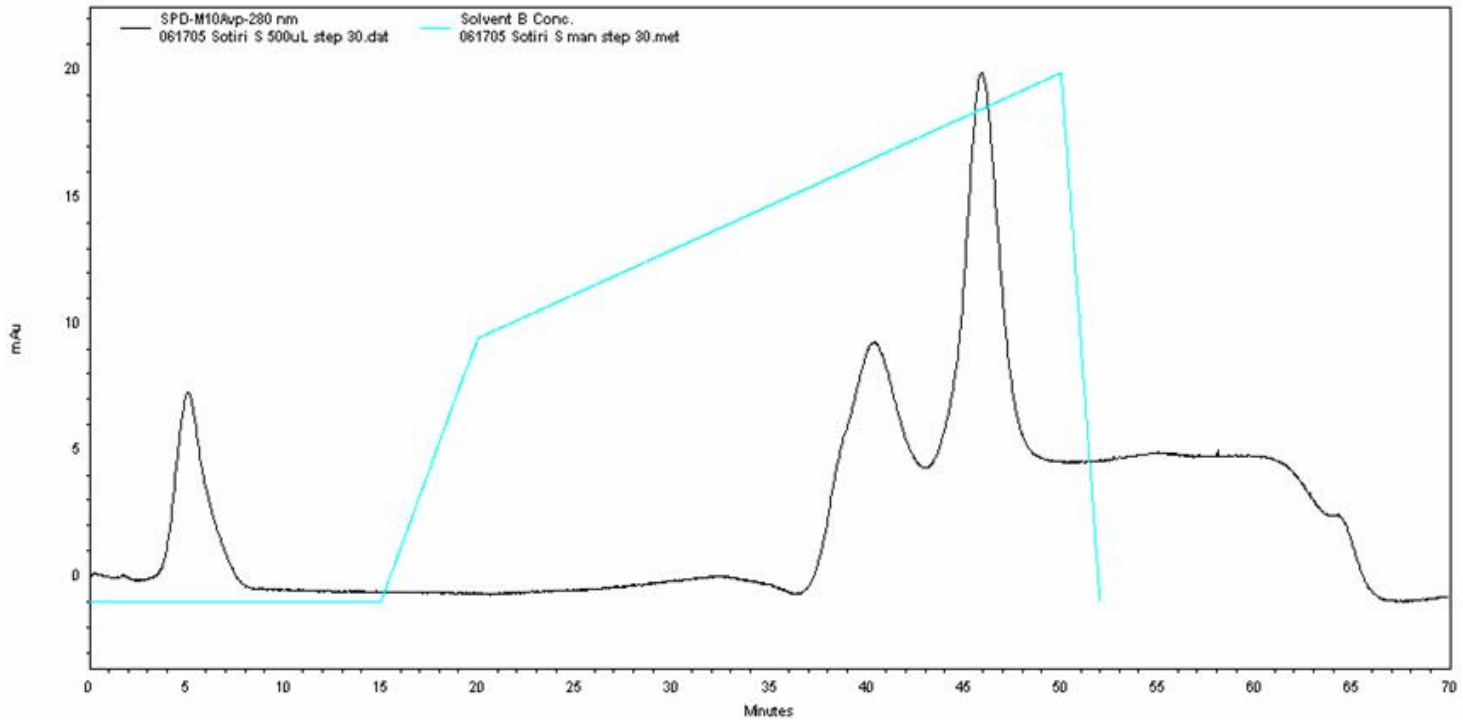
Εικ. 48. Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων Δείγματος mSR-BI-t1 σε Στήλη pH 6 με Πρηνές NaCl 0 - 50%.



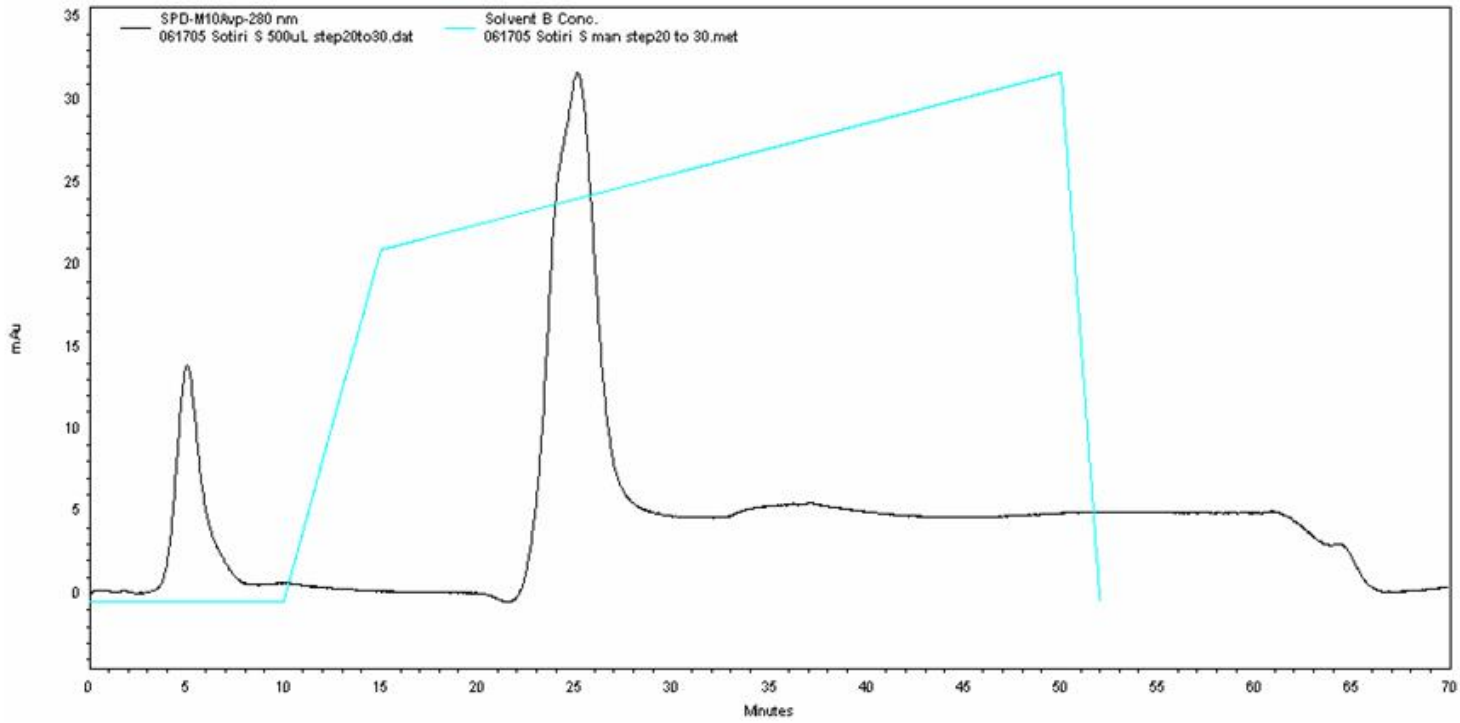
Εικ. 49. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους με Στήλη TSK Δείγματος mSR-BI-t1 Μετά από Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων σε Στήλη pH 6, όπου είναι Εμφανής η Αύξηση του Πληθυσμού των Ολιγομερών.



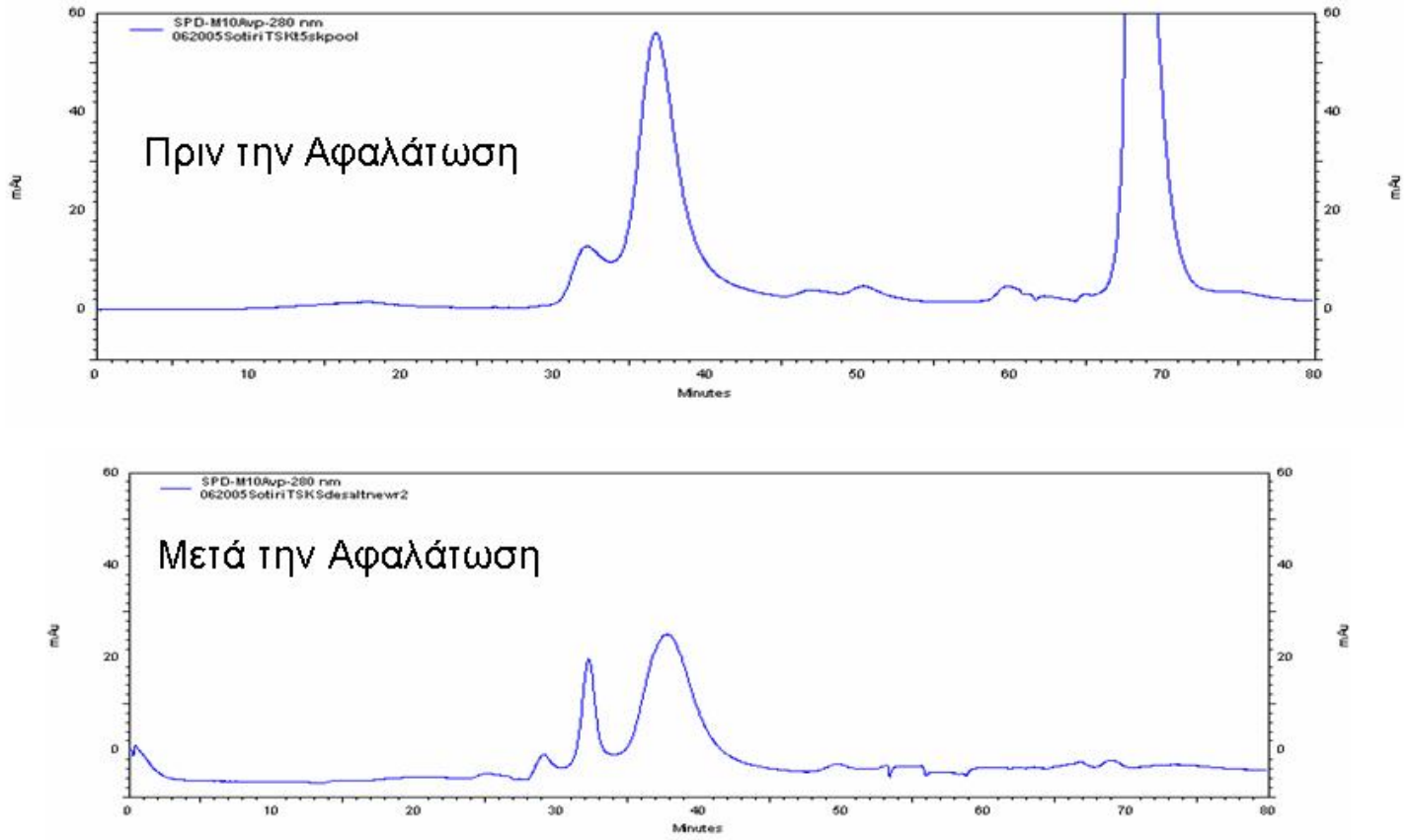
Εικ. 50. Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων Δείγματος mSR-BI-t1 σε Στήλη pH 6 με Πρηνές NaCl 0% - 30%.



Εικ. 51. Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων Δείγματος SR-BI σε Στήλη pH 6 με Πρηνές NaCl 0%-15% και 15%-30%.



Εικ. 52. Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων Δείγματος mSR-BI-t1 σε Στήλη pH 6 με Πρηνές NaCl 0% - 20% και 20% - 30%. Η Διπλή Κορυφή που Εμφανίζεται στις Προηγούμενες Τρεις Εικόνες Γίνεται Ξανά Μονήρης.



Εικ. 53. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους με Στήλη TSK, Δείγματος mSR-BI-t1 Υποβληθέντος σε Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων σε pH 6, Πριν και Μετά από Αφαλάτωση σε 10 mM NaCl – Μετά την Αφαλάτωση Εμφανίζεται μία Πρόσθετη Κορυφή και Επίταση της Κορυφής των Ολιγομερών.

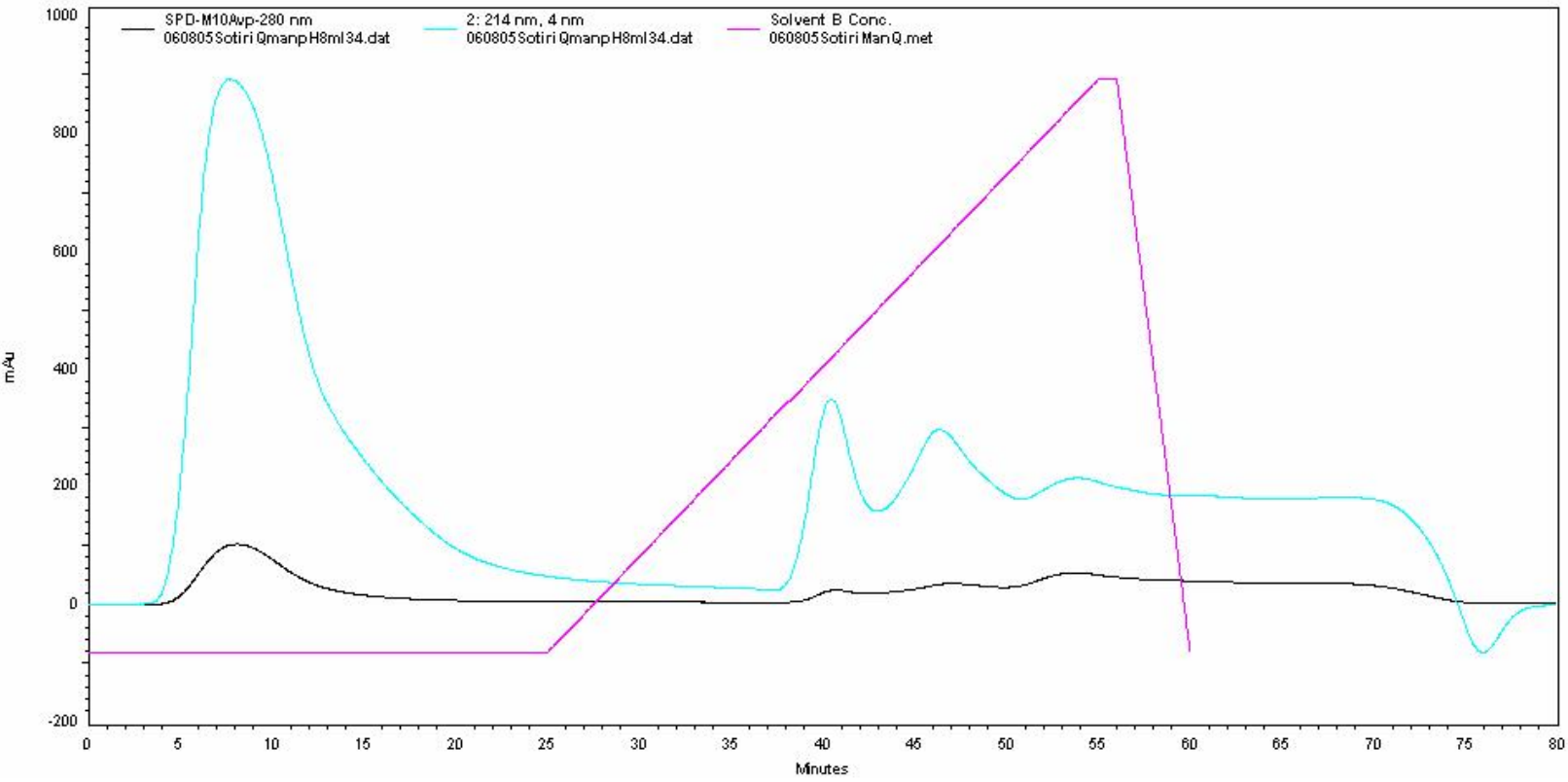
συγκέντρωσης NaCl δεν απεδείχθη αποτελεσματική, καθώς υπό αυτές τις συνθήκες ο mSR-BI-t1 ολιγομερίζεται.

Αντίθετα, η απομόνωση του mSR-BI-t1 με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής σε pH 8 (Εικ.54) φαίνεται να ελλατώνει τη συγκέντρωση των ολιγομερών (Εικ.55) και η αναλογία μονομερών και ολιγομερών δεν μεταβάλλεται για τουλάχιστον επτά ημέρες μετά τον καθαρισμό (Εικ.56).

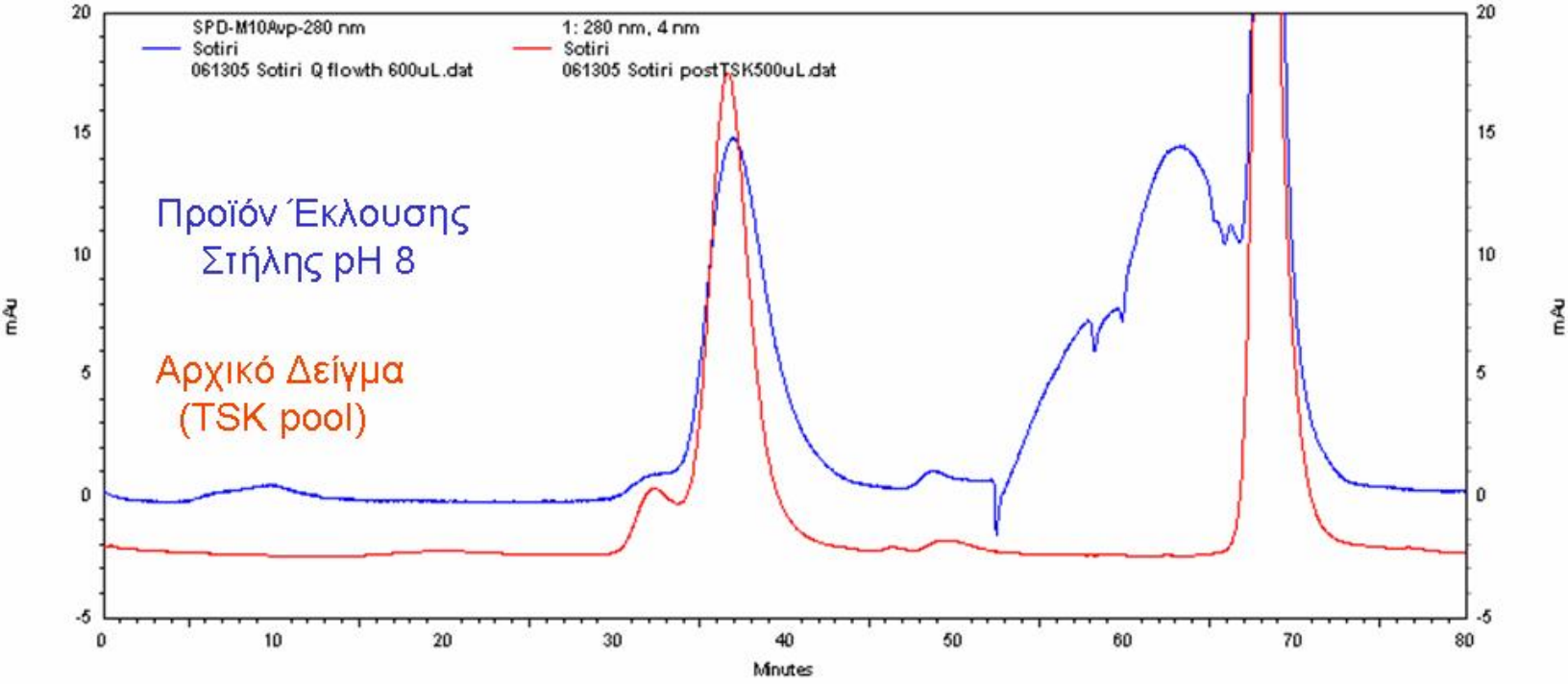
Τέλος, η απομόνωση του mSR-BI-t1 σε pH 9 (Εικ.57) βελτιώνει την αναλογία ολιγομερών/μονομερούς. Η αναλογία αυτή αυξάνεται μετά από 14 ημέρες παραμονής του δείγματος σε pH 7.2 (Εικ.58). Επιπλέον, τα δείγματα που διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής σε pH 9 έχουν μικρότερο ποσοστό ολιγομερών σε 100 mM NaCl εν σχέσει με 10 mM NaCl (Εικ.59).

11. Παραγωγή Κρυστάλλων mSR-BI-t1

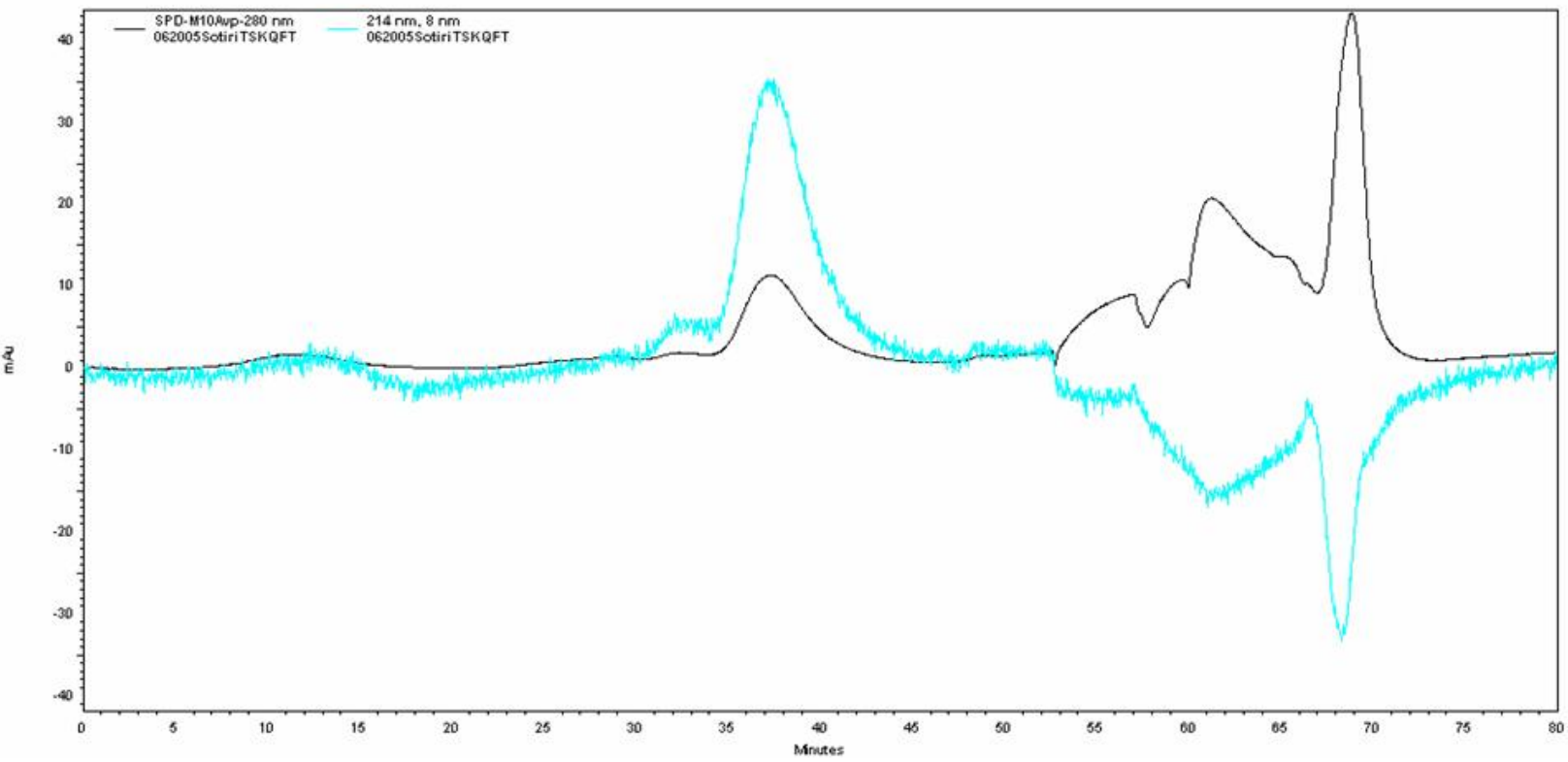
Προκειμένου να πραγματοποιηθούν δοκιμές κρυστάλλωσης του mSR-BI-t1, που ήταν ο βασικός στόχος της διατριβής μου, συνελέγησαν τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης που αντιστοιχούν στη μείζωνα χρωματογραφική καμπύλη (μονομερή του υποδοχέα). Στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν και επαναχρωματογραφήθηκαν προκειμένου να μειωθεί η συγκέντρωση του απορρυπαντικού octyl glucoside στο δείγμα. Έπειτα, τέθηκαν σταγόνες πρωτεϊνικού δείγματος για κρυστάλλωση. Είναι ενδιαφέρον ότι οι σταγόνες αυτές, των οποίων το μέγεθος ήταν περίπου 200nl, διαχωρίστηκαν σε φάσεις. Αυτό προφανώς σημαίνει ότι η συγκέντρωση του απορρυπαντικού στα δείγματα ήταν πολύ υψηλή, παρά το γεγονός ότι τα δείγματα είχαν υποστεί διάλυση έναντι χαμηλής συγκέντρωσης απορρυπαντικού για τρεις μέρες πριν τις δοκιμές κρυστάλλωσης. Αυτό το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε κατ'αρχάς με προσθήκη διαφόρων ενώσεων στα δείγματα και έλεγχο της επίπτωσής τους στο φαινόμενο αυτό. Έτσι φάνηκε, για παράδειγμα, ότι το NaCl σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0.75M παράγει καλύτερους κρυστάλλους, υπό την έννοια ότι μειώνεται δραστικά ο διαχωρισμός φάσης.



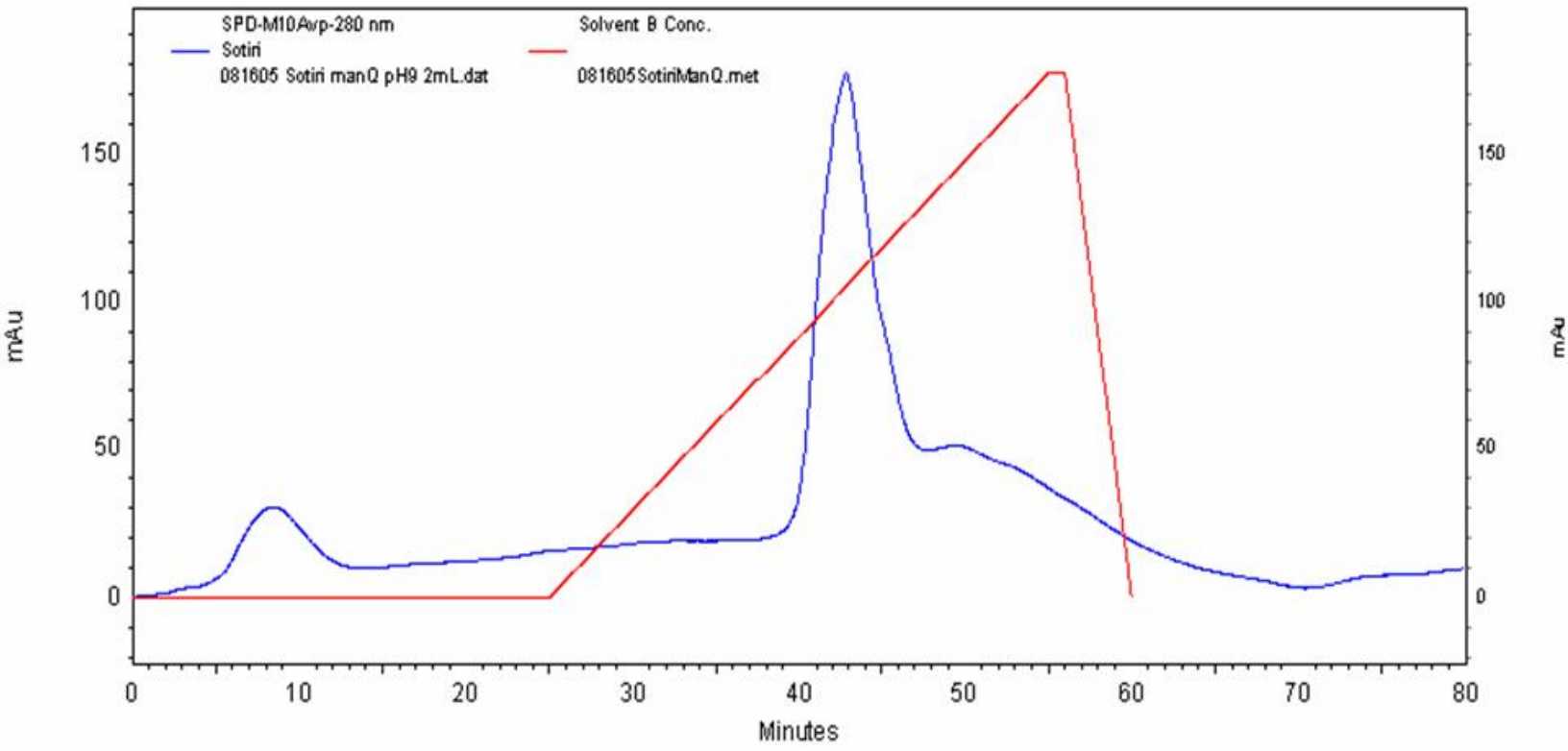
Εικ. 54. Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων Δείγματος mSR-BI-t1 σε pH 8



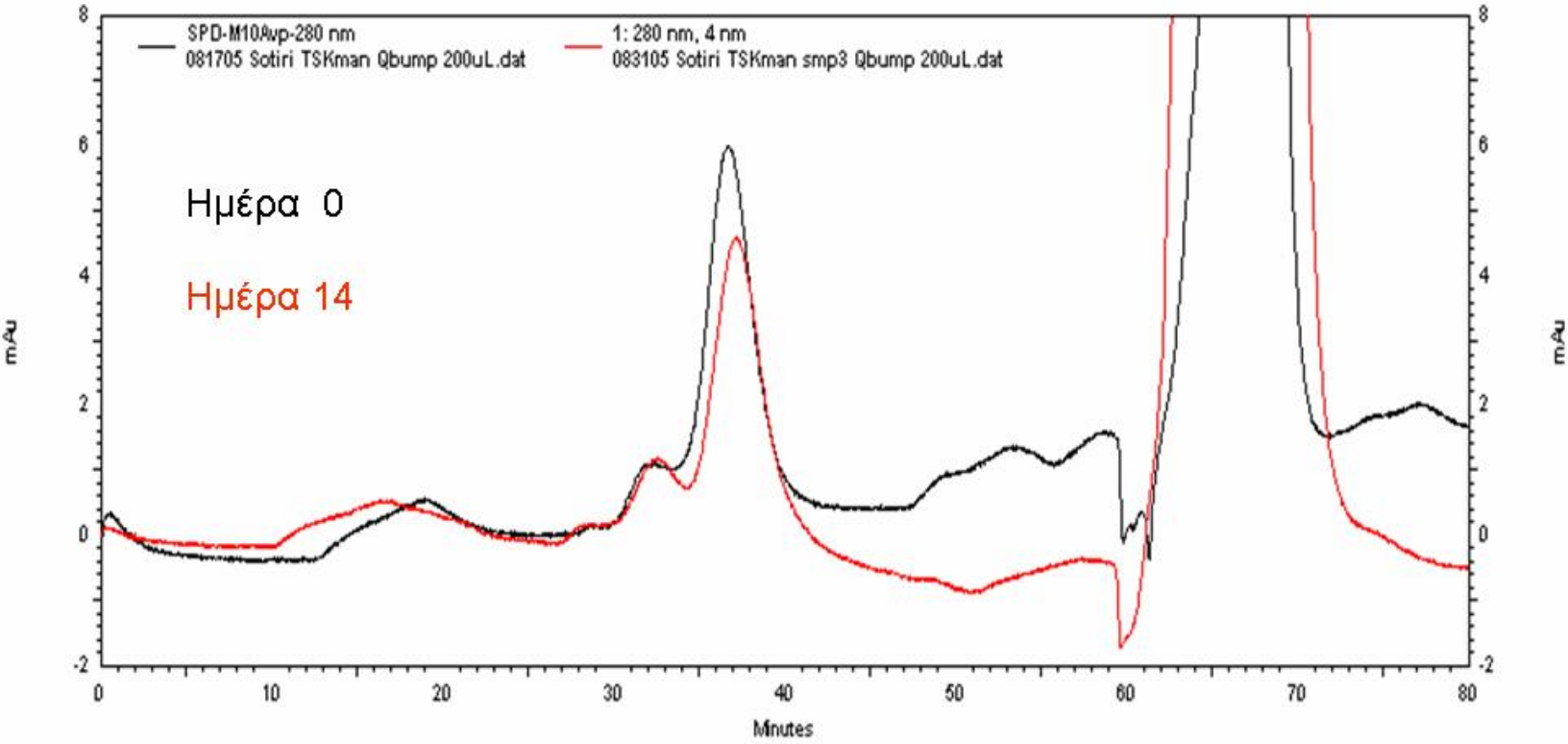
Εικ. 55. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους των Προϊόντων Έκλουσης Στήλης Ανταλλαγής Ιόντων pH 8 η οποία Παρουσιάζει Μειωμένη την Κορυφή Ολιγομερών του mSR-BI-t1 σε Σχέση με το Αρχικό Δείγμα (Μετά από Αρχική Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους με Στήλη TSK).



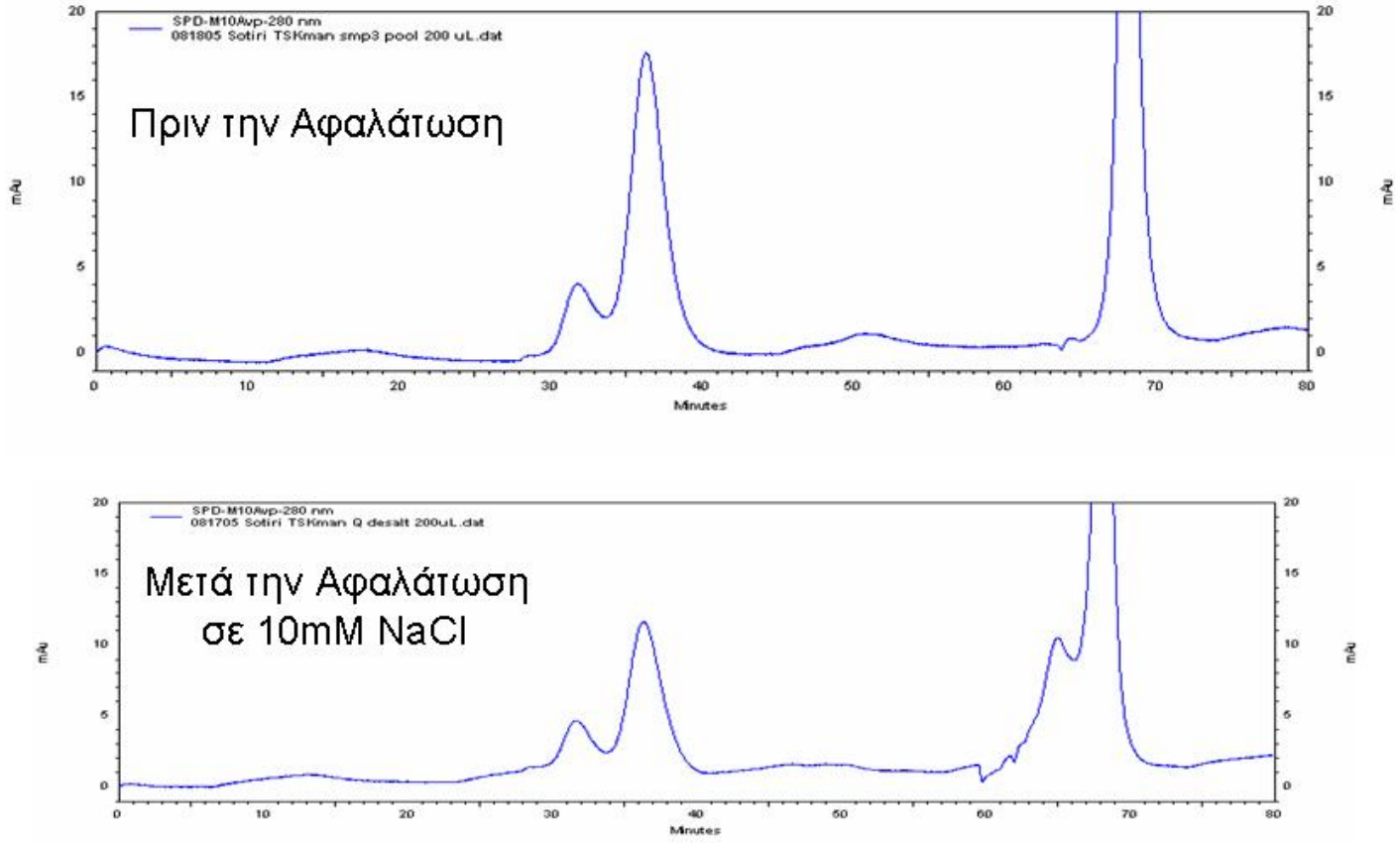
Εικ. 56. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους των Προϊόντων Έκλουσης Χρωματογραφίας Ανταλλαγής Ιόντων σε pH 8. Δεν Υπάρχει Εμφανής Αύξηση στον Πληθυσμό των Ολιγομερών μετά από 7 ημέρες Διατήρησης στους 4° C (Σύγκριση με Εικ.55)



Εικ. 57. Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων του mSR-BI-t1 σε pH 9. Σημαντική Ποσότητα της Πρωτεΐνης Κατακρατείται από τη Στήλη Χρωματογραφίας και Εκλούεται με το Πρηνές Άλατος



Εικ. 58. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε Στήλη TSK, Προϊόντων Χρωματογραφίας Ανταλλαγής Ιόντων σε pH 9 και σε Χρόνο T=0 και 14 Ημέρες Μετά την Παραγωγή τους. Ο Πληθυσμός των Ολιγομερών Μειώνεται μετά τη Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων, αλλά Αυξάνεται Ελαφρά μετά από 2 Εβδομάδες.



Εικ. 59. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους σε Στήλη TSK, Δείγματος mSR-BI-t1 Υποβληθέντος σε Χρωματογραφία Ανταλλαγής Ιόντων σε pH 9, Πριν και Μετά από Αφαλάτωση σε 10mM NaCl - Φαίνεται η Αύξηση της Αναλογίας Ολιγομερών/ Μονομερούς mSR-BI-t1 Μετά την Αφαλάτωση.

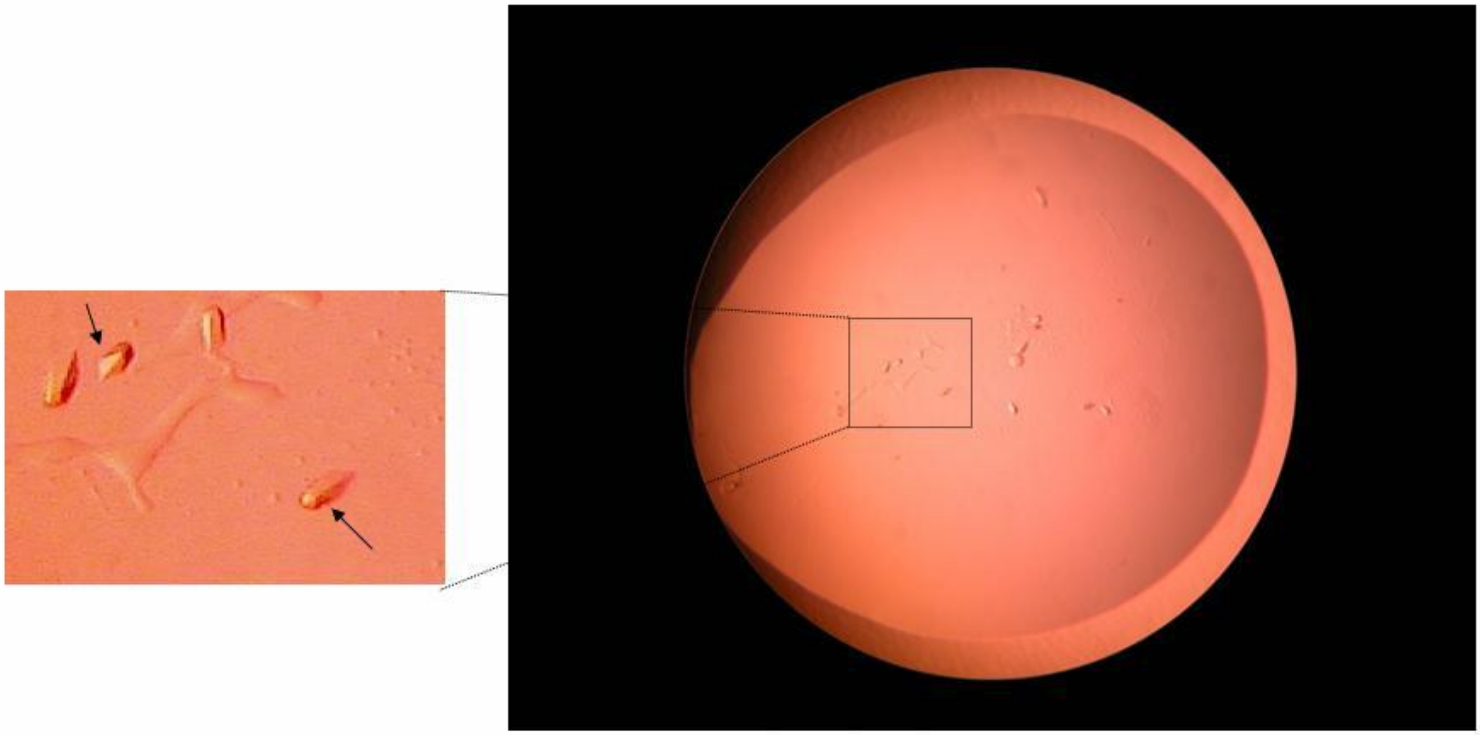
Μετά τη δοκιμή πολλών συνθηκών, σχηματίστηκαν πολλοί, μικροί, κυρίως εξάγωνικοί κρύσταλλοι (30-40μm κατά το μακρύτερο άξονα), οι οποίοι ήταν αρχικά μάλλον δισδιάστατοι αλλά στη συνέχεια αυξήθηκαν σε μέγεθος (Εικ.60). Το γεγονός ότι προσλαμβάνουν πρωτεϊνική χρωστική 'Izit' (Hampton Research) δείχνει επιπλέον ότι είναι πραγματικοί πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι (Εικ.61).

Οι κρύσταλλοι σχηματίζονται μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες, π.χ. NEXTAL's Classics Screen # 94 (10% w/v PEG 6000, 2M NaCl) ή 0.2M tri-potassium citrate με 17% PEG 3350 ή 17 έως 20% w/v PEG 3350, 0.1M Tris pH 7.5 και 0.2M potassium sodium tartrate. Οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα π.χ. Mops, Hepes, Bis-Tris Propane με τιμή pH μεταξύ 6 και 7.5 αποδείχθηκε κατάλληλο για το σχηματισμό κρυστάλλων. Δοκιμές γύρω από τις προαναφερθείσες συνθήκες δεν οδήγησε σε κρυστάλλωση. Οι δοκιμές κρυστάλλωσης περιλαμβάνουν και χρήση πρόσθετων χημικών ουσιών. Από τέτοιες δοκιμές δείχθηκε π.χ. ότι η πολυβινυλπυρολιδόνη προωθεί την κρυστάλλωση. Ο χρόνος σχηματισμού των κρυστάλλων ήταν περίπου τέσσερις ημέρες.

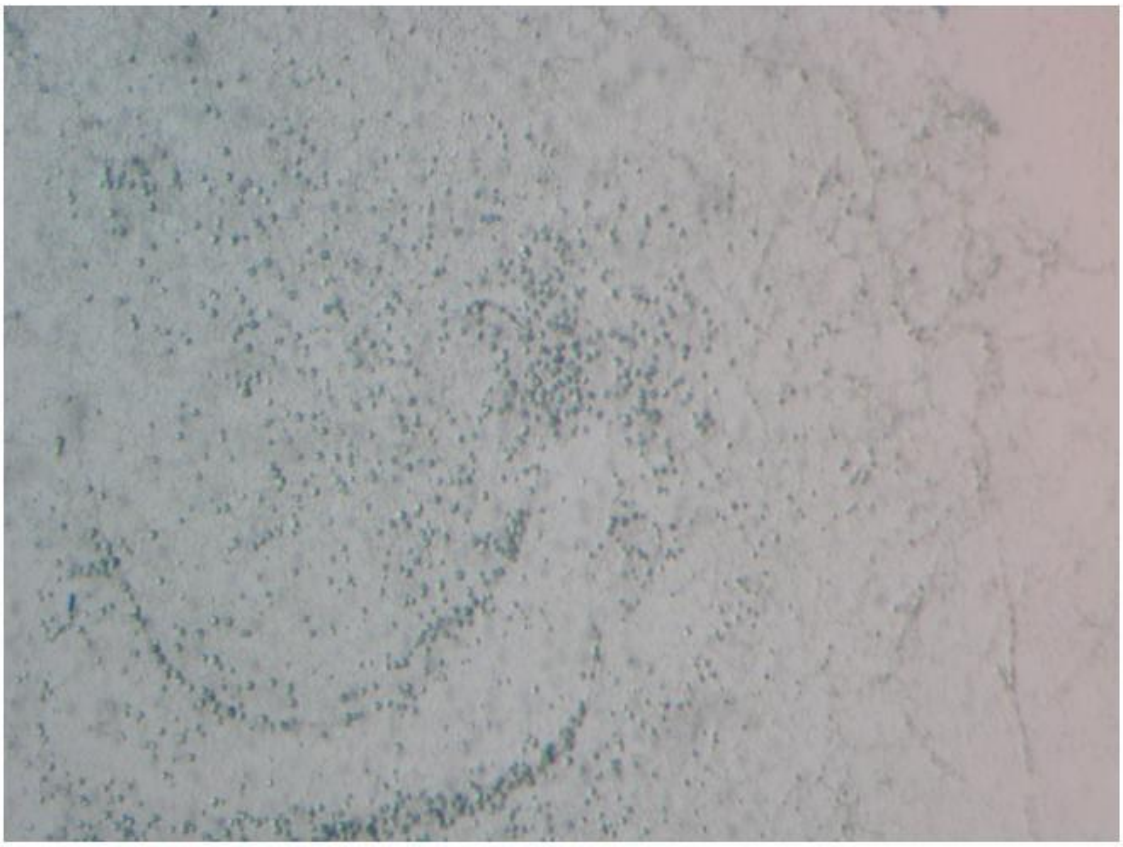
Συμπερασματικά, παρ'ότι είναι γενικά επιθυμητοί λίγοι και πιο ευμεγέθεις κρύσταλλοι, αυτοί που σχηματίστηκαν ήταν ικανοποιητικοί για αρχικές δοκιμές κρυσταλλογραφίας με ακτίνες Χ, οι οποίες βρίσκονται υπό εξέλιξη.

12. Αλληλεπίδραση HDL Ανθρώπου και Ποντικού με Κύτταρα που Εκφράζουν Αγρίου Τύπου SR-BI και Πρωτεο-Λιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης / Χοληστερόλης / mSR-BI-t1

Στην ενότητα αυτή περιγράφονται πειράματα πρόσδεσης της HDL και πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης σε κύτταρα που εκφράζουν SR-BI καθώς και πειράματα πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης από τον SR-BI ανασυστημένο σε πρωτεολιποσώματα. Απώτερος στόχος ήταν να βελτιστοποιηθεί η μεθοδολογία για παρόμοια πειράματα στο μέλλον με χρήση κυττάρων που εκφράζουν αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές SR-BI, καθώς και HDL που περιέχει αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές apoAI. Η δυνατότητα έκφρασης μεταλλαγμένων μορφών



Εικ. 60. Κρύσταλλοι mSR-BI-t1

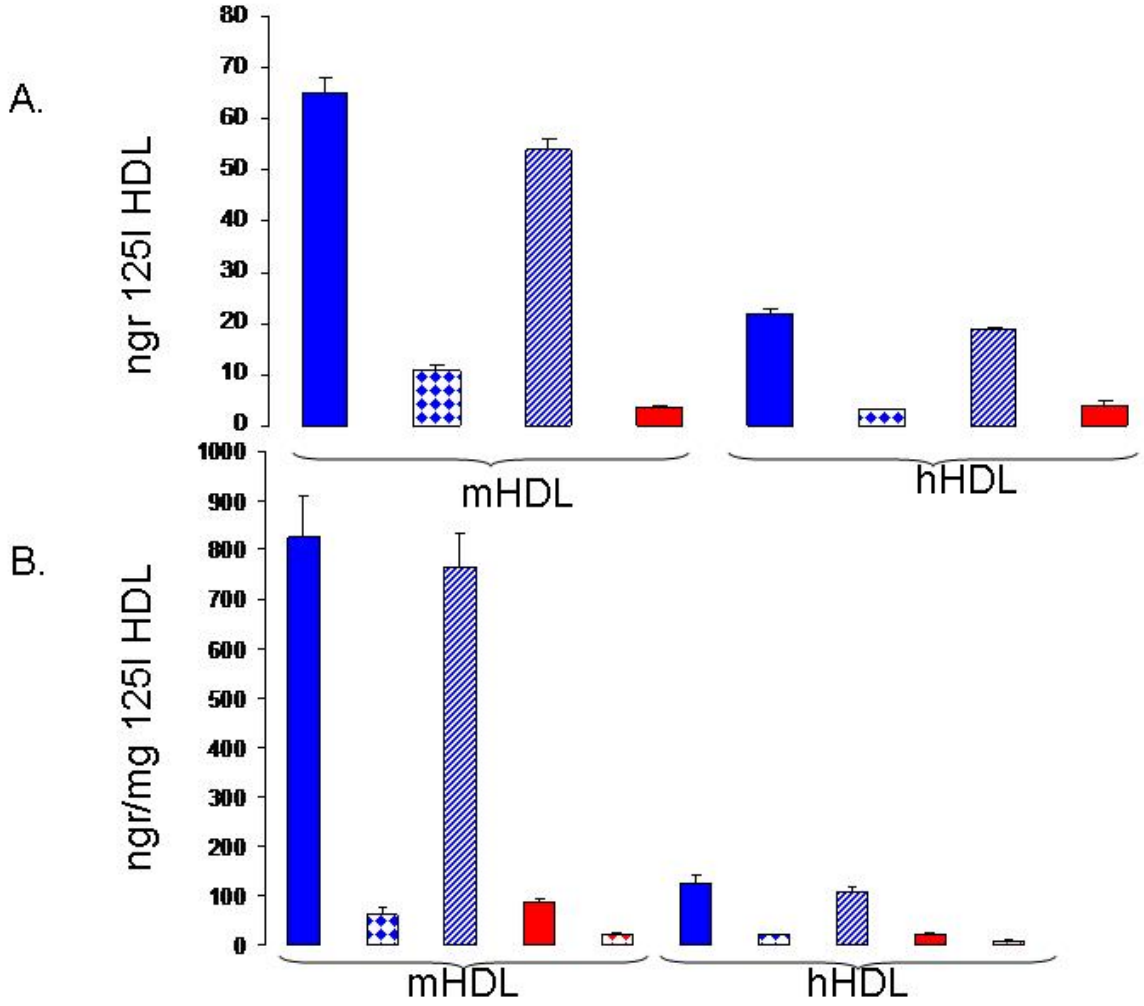


Εικ. 61. Οι Κρύσταλλοι του mSR-BI-t1 Προσλαμβάνουν Χρωστική IZIT

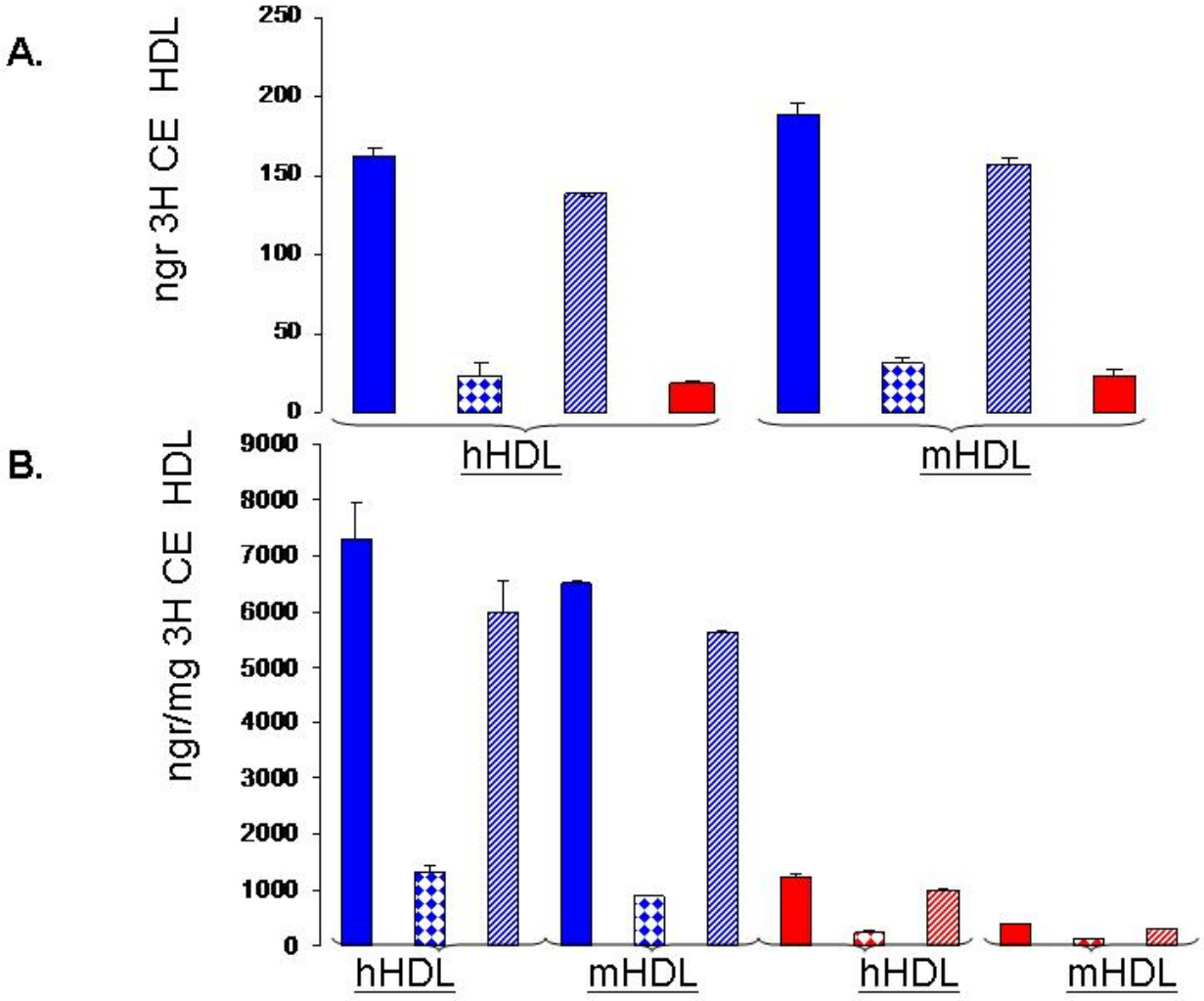
απολιποπρωτεινών σε ποντίκια με το σύστημα των αδενοϊών και απομόνωσης της μεταλλαγμένης HDL από αυτά (210), καθώς και της διεξαγωγής πειραμάτων πρόσδεσης της HDL και πρόσληψης αιθέρων χοληστερόλης από την HDL, μέσω του SR-BI, σε κύτταρα και πρωτεολιποσώματα (που έχει περιγραφεί πιο πάνω), δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων αλληλεπίδρασης μεταλλαγμένων μορφών της HDL με αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές του SR-BI. Αρχικά, για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών, τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν με HDL απομονωμένη από αγρίου τύπου ποντικούς και από άνθρωπο.

Η δοκιμασία πρόσδεσης ραδιοσημασμένης HDL (^{125}I-HDL) ποντικού και ανθρώπου και πρόσληψης αιθέρων χοληστερόλης (^{3}H-CE) από ραδιοσημασμένη HDL (^{3}H-CE-HDL) ποντικού και ανθρώπου παρουσιάζονται στις Εικόνες 62 και 63, αντίστοιχα. Οι δοκιμασίες αυτές έγιναν σε κύτταρα CHO (Chinese Hamster Ovary) που εκφράζουν σταθερά αγρίου τύπου SR-BI και σε πρωτεολιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης / Χοληστερόλης / mSR-BI-t1 (μοριακή αναλογά 5 μέρη Φωσφατιδυλχολίνης / 1 μέρος Χοληστερόλης), για μοναδική συγκέντρωση HDL (10μg/ml) (Εικόνες 62 και 63) [σε πειράματα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου κύτταρα CHO και λιποσώματα χωρίς mSR-BI-t1 (-SR-BI)]. Για τον προσδιορισμό της μη-ειδικής πρόσδεσης έγινε επώαση με περίσσεια (X40) μη-σημασμένης HDL (Hot+Cold), η οποία καταλαμβάνει όλες τις ειδικές θέσεις πρόσδεσης στον SR-BI. Η τελική επεξεργασία της HDL του ανθρώπου κατά την ιωδίωση έγινε με τη μέθοδο της διαπίδυσης, ενώ για την HDL του ποντικού έγινε με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης (βλέπε «Υλικά και Μέθοδοι»). Για την παρασκευή των πρωτεολιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκε καθαρή mSR-BI-t1 με περιορισμένη και ομοιογενή γλυκοζυλίωση, που παρήχθη με χρήση χρωματογραφίας ανοσοσυγγενείας, όπως περιεγράφη στις μεθόδους. Τα πειράματα αυτά κατέδειξαν ότι η HDL του ποντικού προσδένεται στον SR-BI πολύ ισχυρότερα από ότι στον SR-BI του ανθρώπου, ενώ η πρόσληψη αιθέρων χοληστερόλης της HDL του ποντικού και του ανθρώπου μέσω του SR-BI, δεν παρουσιάζει μεγάλη διαφορά.

Προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι η διαφορά στην πρόσδεση της HDL του ανθρώπου και του ποντικού στον SR-BI οφείλεται στη διαφορετική επεξεργασία της



Εικ. 62. Δοκιμασία Πρόσδεσης 125I-HDL Ποντικού (mHDL) και Ανθρώπου (hHDL) Σε ΠρωτεολιποσώματαςΦωσφατιδυλχολίνης / Χοληστερόλης / mSR-BI-t1 (A) ή σε Κύτταρα CHO που Εκφράζουν τον SR-BI (B). Τα Μπλε Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ολική (Ειδική και Μη-Ειδική) Πρόσδεση. Τα Τριγωνισμένα (Μπλέ και Κόκκινα) Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν Δείγματα στα οποία Προσετέθη Περίσσεια (X40) Μη-Σημασμένης HDL (Μη-Ειδική Πρόσδεση). Τα Γραμμοσκιασμένα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ειδική Πρόσδεση (Ολική Μείον Μη-Ειδική). Τα Κόκκινα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν Λιποσώματα τα Οποία δεν Περιέχουν SR-BI και Κύτταρα CHO τα Οποία δεν Εκφράζουν SR-BI.



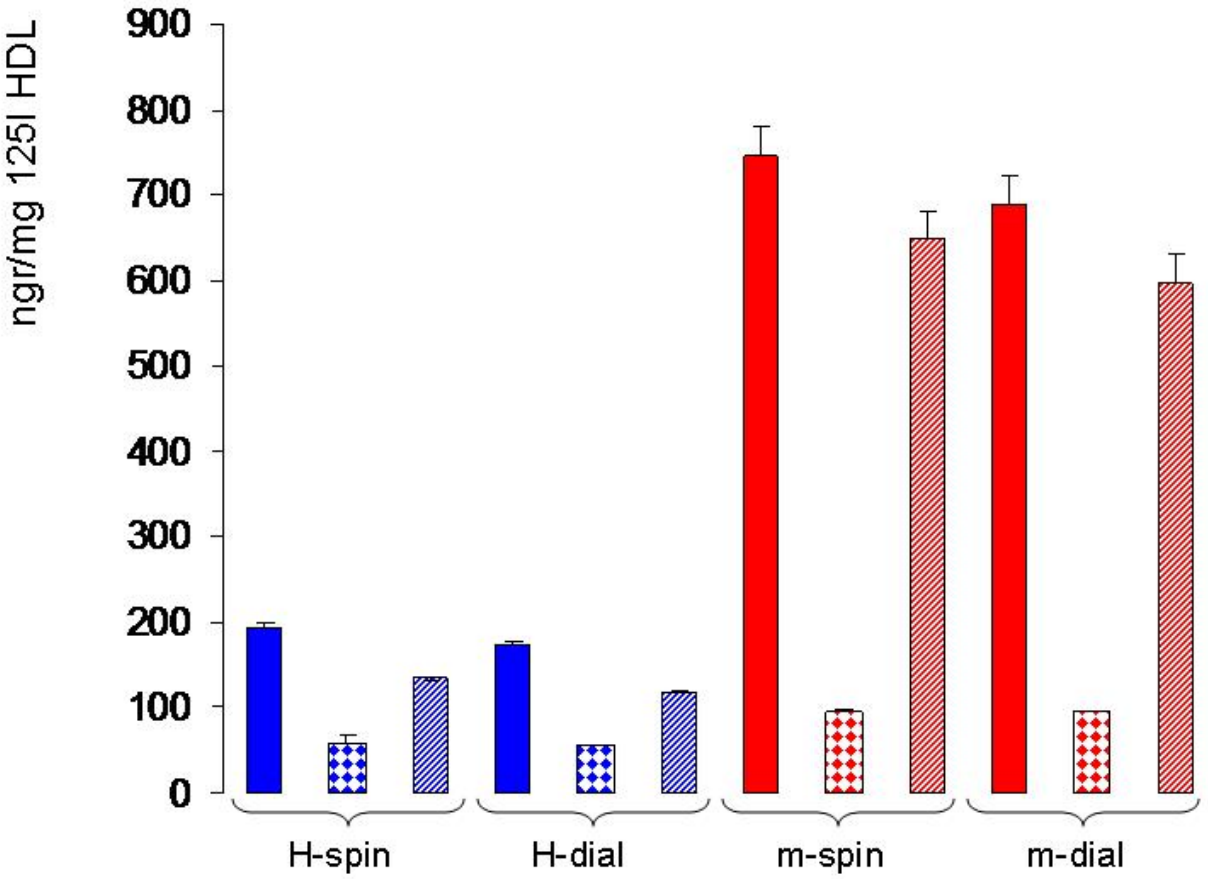
Εικ. 63. Δοκιμασία Πρόσληψης 3Η-Αιθέρων Χοληστερόλης (CE) από 3 H-CE HDLΠοντικού (mHDL) και Ανθρώπου (hHDL) σε Πρωτεολιποσώματα Φωσφατιδυλχολίνης / Χοληστερόλης / mSR-BI-t1 (A) ή σε Κύτταρα CHO που Εκφράζουν Σταθερά SR-BI (B). Τα Μπλε Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ολική (Ειδική και Μη-Ειδική) Πρόσληψη. Τα Τριγωνισμένα (Μπλέ και Κόκκινα) Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν Δείγματα στα οποία Προσετέθη Περίσσεια (X40) Μη-Σημασμένης HDL (Μη-Ειδική Πρόσληψη). Τα Γραμμοσκιασμένα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ειδική Πρόσληψη (Ολική Μείον Μη-Ειδική). Τα Κόκκινα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν Λιποσώματα τα Οποία δεν Περιέχουν SR-BI και Κύτταρα CHO τα Οποία δεν Εκφράζουν SR-BI.

HDL για τον καθαρισμό της μετά την ιχνιθέτηση με ^{125}I ή ^{3}H-αιθέρες χοληστερόλης , επαναλήφθηκαν οι κυτταρικές δοκιμασίες πρόσδεσης της ^{125}I-HDL και πρόσληψης ραδιοσημασμένων αιθέρων χοληστερόλης (^{3}H-CE), με HDL ανθρώπου και ποντικού που υπεβλήθησαν και στις δύο μεθόδους τελικού καθαρισμού μετά την ιχνιθέτηση.

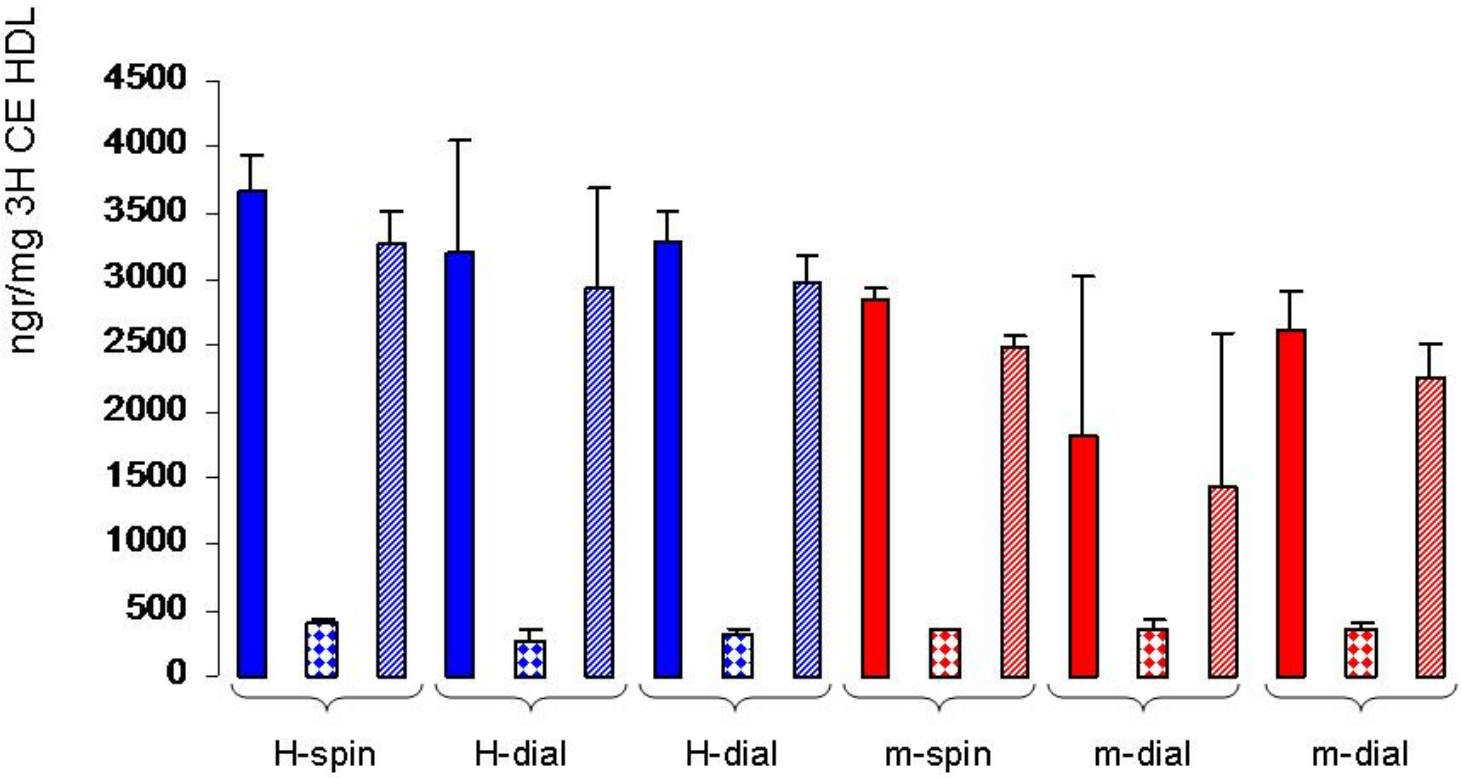
Η εικόνα 64 παρουσιάζει την πρόσδεση της ^{125}I-HDL ανθρώπου (A) ή ποντικού (B) σε κύτταρα που εκφράζουν τον SR-BI (CHO ldl-mSR-BI) [απουσία (έγχρωμα παραλληλόγραμμα) και παρουσία 40X περίσσειας μη σεσημασμένης HDL (παραλληλόγραμμα με έγχρωμες τελείες). Η διαφορά των δύο τιμών αντιπροσωπεύει την ειδική πρόσδεση (έγχρωμα γραμμοσκιασμένα παραλληλόγραμμα)]. Η εικόνα 65 παρουσιάζει την πρόσληψη των ραδιοσεσημασμένων αιθέρων χοληστερόλης ^{3}H-CE από κύτταρα που εκφράζουν τον SR-BI (CHO ldlA-mSR-BI) απουσία (έγχρωμα παραλληλόγραμμα) ή παρουσία 40X περίσσεια μη σεσημασμένης HDL (παραλληλόγραμμα με έγχρωμες τελείες). Η διαφορά των δύο τιμών αντιπροσωπεύει την ειδική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από τα κύτταρα (έγχρωμα παραλληλόγραμμα).

Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων πρόσδεσης της HDL του ανθρώπου και του ποντικού στον SR-BI, επροσδιορίσθη η καμπύλη κορεσμού (βλέπε πιο πάνω) της ^{125}I-HDL του ανθρώπου και του ποντικού, σε κύτταρα CHO (ldlA) που εκφράζουν σταθερά τον mSR-BI. Στη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν μίγματα HDL αποτελούμενα από σημασμένη HDL, που είχαν καθαρισθεί με τις μεθόδους υπερφυγοκέντρησης και διύλισης. Η ανάλυση αυτή έδωσε τιμές K_D= 51.4+/-5.4 μg/mg και B_{MAX}= 1711+/-85 μg/mg για την αλληλεπίδραση της HDL του ανθρώπου με τον mSR-BI και τιμές K_D= 11.52+/-0.7 μg/mg και B_{MAX}= 1880+/-28 μg/mg για την αλληλεπίδραση της HDL του ποντικού με τον mSR-BI. Η ανάλυση αυτή επιβεβαίωσε ότι η HDL του ποντικού προσδένεται στον SR-BI πολύ ισχυρότερα από ότι του ανθρώπου (Εικ. 66).

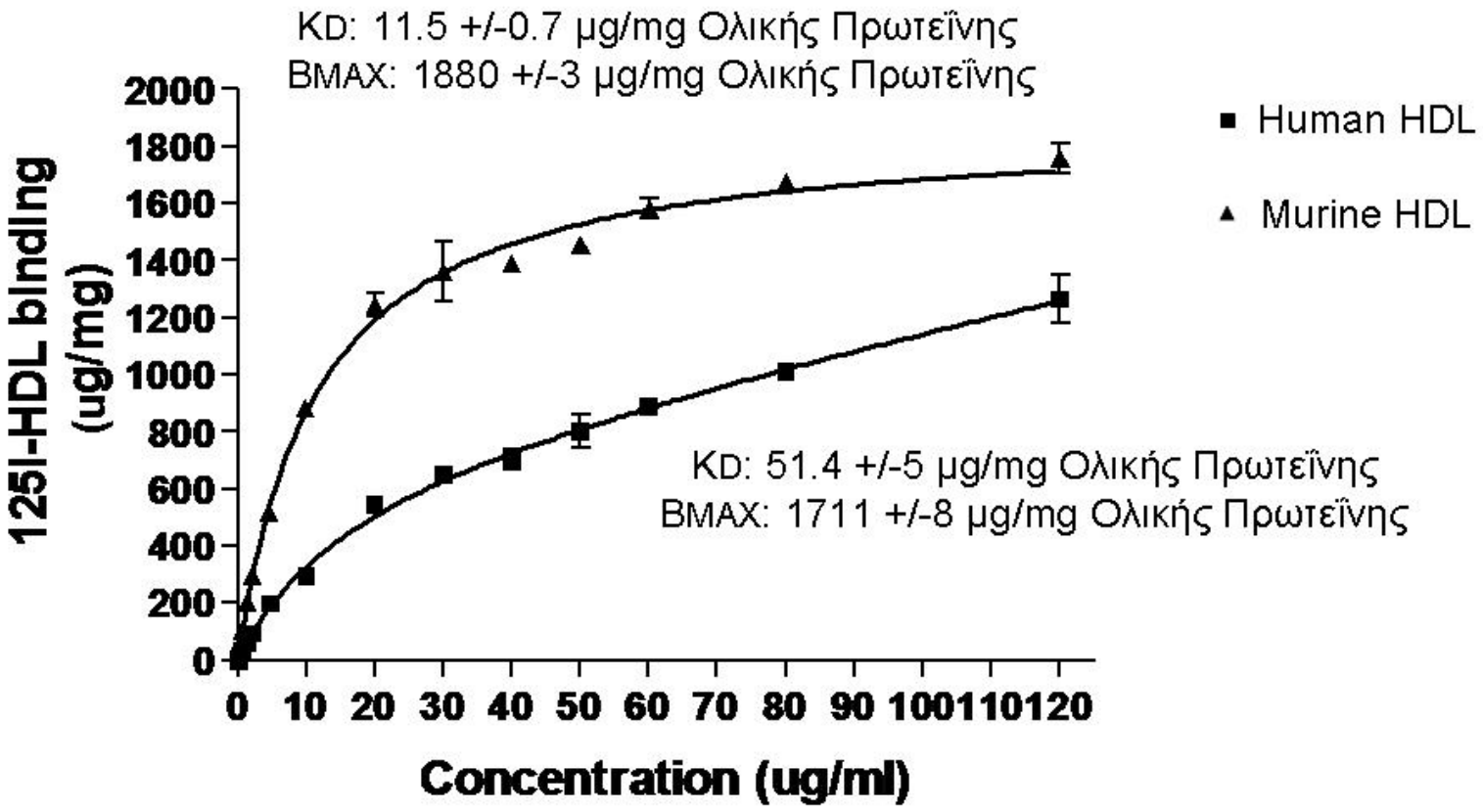
Επειδή τα δείγματα ανθρώπινης HDL που είχαν παραχθεί με τη μέθοδο της διύλισης περιείχαν μεγάλη ποσότητα αλβουμίνης, η καμπύλη πρόσδεσης κορεσμού της ^{125}I-HDL επαναλήφθηκε με δείγματα HDL ανθρώπου και ποντικού που παρήχθησαν με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης μόνο, τα οποία δεν περιείχαν αλβουμίνη (Εικ. 67). Τα αποτελέσματα



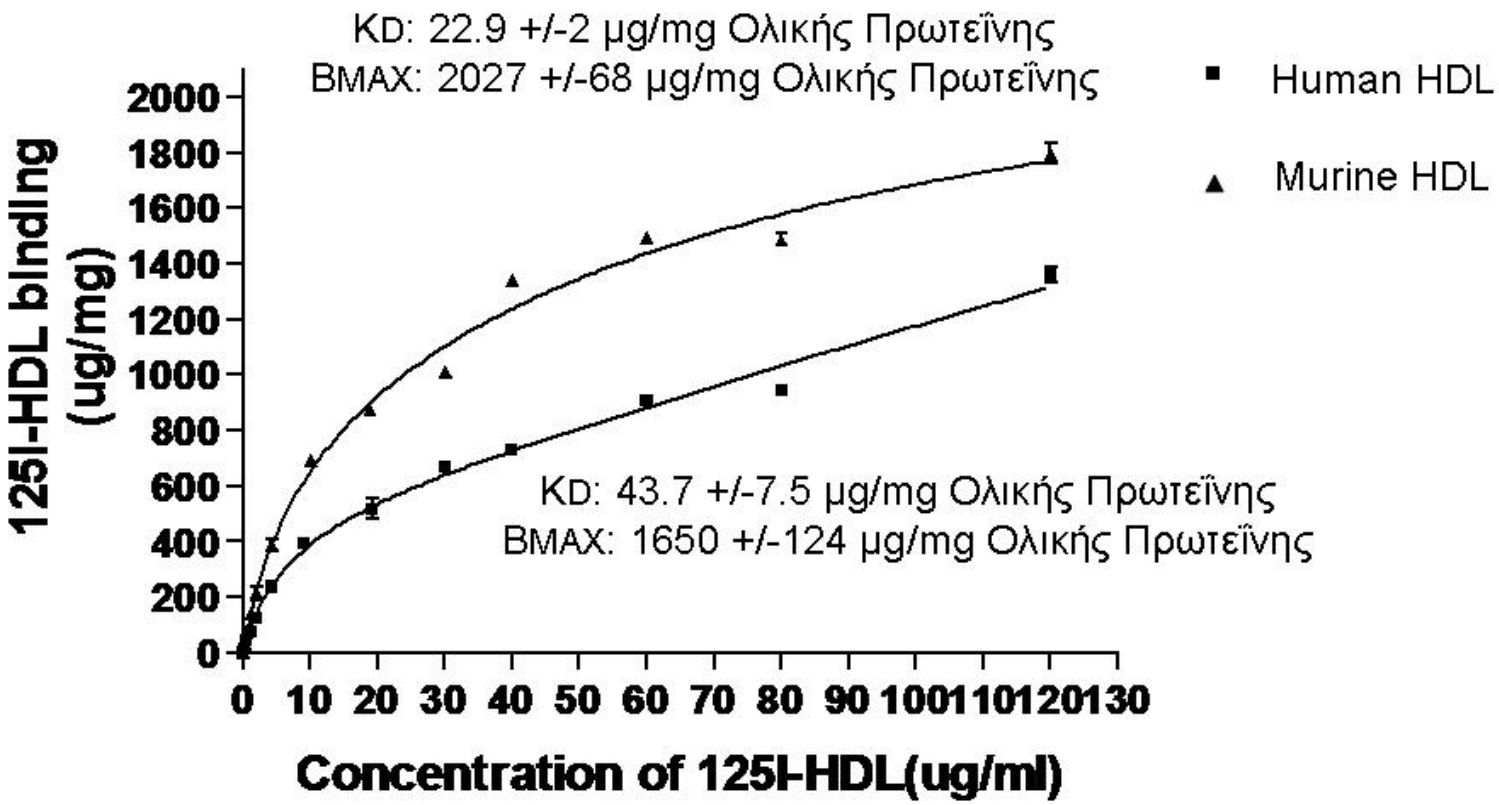
Εικ. 64. Δοκιμασία Πρόσδεσης 125I-HDL Ποντικού (m, Κόκκινο Χρώμα) και Ανθρώπου (H, Μπλέ Χρώμα), που Παρήχθη με τη Μέθοδο της Φυγοκέντρησης (spin) ή της Διαπίδυσης (dial), σε Κύτταρα CHO που Εκφράζουν Σταθερά SR-BI. Τα Πλήρη Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ολική (Ειδική και Μη-Ειδική) Πρόσδεση. Τα Τριγωνισμένα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν Δείγματα στα οποία Προσετέθη Περίσσεια (X40) Μη-Σημασμένης HDL (Μη-Ειδική Πρόσδεση). Τα Γραμμοσκιασμένα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ειδική Πρόσδεση (Ολική Μείον Μη-Ειδική).



Εικ. 65. Δοκιμασία Πρόσληψης 3Η-Αιθέρων Χοληστερόλης (CE) από 3Η-CE HDL Ποντικού (m, Κόκκινο Χρώμα) και Ανθρώπου (H, Μπλέ Χρώμα) που Παρήχθη με τη Μέθοδο της Φυγοκέντρησης (spin) ή της Διαπίδυσης (dial), σε Κύτταρα CHO που Εκφράζουν Σταθερά SR-BI. Τα Πλήρη Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ολική (Ειδική και Μη-Ειδική) Πρόσληψη. Τα Τριγωνισμένα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν Δείγματα στα οποία Προσετέθη Περίσσεια (X40) Μη-Σημασμένης HDL (Μη-Ειδική Πρόσληψη). Τα Γραμμοσκιασμένα Παραλληλόγραμμα Αντιπροσωπεύουν την Ειδική Πρόσδεση (Ολική Μείον Μη-Ειδική).



Εικ. 66. Καμπύλη Πρόσδεσης Κορεσμού 125I-HDL Ποντικού και Ανθρώπου σε Κύτταρα CHO που Εκφράζουν Σταθερά SR-BI. Παρουσιάζεται η Καμπύλη Ειδικής Πρόσδεσης



Εικ. 67. Η Καμπύλη Πρόσδεσης Κορεσμού 125I-HDL Ποντικού και Ανθρώπου σε Κύτταρα CHO που Εκφράζουν Σταθερά SR-BI – Παρουσιάζεται η Καμπύλη Ειδικής Πρόσδεσης

αυτής της ανάλυσης έδωσαν τιμές K_D= 44+/-7 μg/mg και B_{MAX}= 1650+/-124 μg/mg για την αλληλεπίδραση της HDL του ανθρώπου με τον mSR-BI και τιμές K_D= 23+/-2 μg/mg και B_{MAX}= 2027+/-68 μg/mg για την αλληλεπίδραση της HDL του ποντικού με τον mSR-BI. Οι τιμές K_D και B_{MAX} που ελήφθησαν από τις δύο αναλύσεις είναι παρόμοιες.

Δ. Συζήτηση

Ο SR-BI παίζει κεντρικό ρόλο στην ομοιόσταση της χοληστερόλης. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του παρατηρούνται σε στεροειδογόνους ιστούς όπως τα επινεφρίδια, που χρησιμοποιούν τη χοληστερόλη της HDL που προσλαμβάνουν μέσω του SR-BI για τη σύνθεση στεροειδών ορμονών (199, 200, 201, 202, 203, 204). Η χοληστερόλη που προσλαμβάνεται από διάφορους ιστούς συμβάλλει στη σταθερότητα της μεμβράνης των κυττάρων των θηλαστικών. Παράλληλα, συμμετέχει στην παραγή χολικών αλάτων στο ήπαρ και στη σύνθεση βιταμίνης D στο δέρμα και τους νεφρούς. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η φυσιολογική δράση του SR-BI είναι πολυσήμαντη και ομοίως, η παθοφυσιολογία της έλλειψής του είναι πολύπλοκη, όπως παρουσιάζεται κατωτέρω.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι ο ρόλος του SR-BI στη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης, καθώς η αθηρωματική νόσος των στεφανιαίων αγγείων είναι κοινή αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στον ανεπτυγμένο κόσμο. Αν και μέχρι σήμερα δεν έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις του SR-BI στον άνθρωπο, πειράματα σε ποντίκια με ταυτόχρονη έλλειψη του SR-BI και της apoE (apoE and SR-BI double knockout mice) οδηγεί στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης και στον πρόωρο θάνατο των ποντικών. Ιστοπαθολογική ανάλυση αυτών των ποντικών φανερώνει βαρειά ισχαιμική παθολογία και υπερτροφία της καρδιάς (179-184). Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση του SR-BI στο ήπαρ μειώνει τη βαρύτητα της αθηρωμάτωσης (185).

Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει επιτευχθεί στην κατανόηση της δράσης του SR-BI στο μοριακό επίπεδο, χρειάζεται η διαλεύκανση της κρυσταλλικής του δομής και οι συνεπακόλουθες μελέτες δομής-λειτουργίας (structure/function), προκειμένου όλα αυτά τα ευρήματα να συμβάλουν σε ένα ενιαίο μοντέλο της λειτουργίας του υποδοχέα αυτού. Αυτός ήταν και ο κύριος στόχος της παρούσας διατριβής, η παρασκευή, δηλαδή, μεγάλων ποσοτήτων καθαρής πρωτεΐνης SR-BI σε μορφή τέτοια που να επιτρέπει την

παραγωγή κρυστάλλων. Αυτό επιχειρήθηκε στο παρελθόν στο εργαστήριο του Dr. Krieger με μικρή επιτυχία. Δύο λόγοι πιθανόν να συνέβαλαν στην ανεπιτυχή προσπάθεια. Ο πρώτος είναι ότι όταν ο SR-BI εκφράστηκε με το σύστημα του βακουλοϊού, οδήγησε σε ανομοιογενώς γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη (Professor Monty Krieger, προσωπική επικοινωνία). Ο δεύτερος λόγος είναι ότι όταν ο SR-BI εκφράστηκε σε κύτταρα HEK, η έκφραση του SR-BI οδήγησε στη συσσωμάτωσή των κυττάρων και τελικά περιόρισε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό τους (βλέπε «Εισαγωγή»).

Η παρούσα διατριβή εστιάστηκε σε δύο βασικούς στόχους. Ο πρώτος στόχος ήταν η αποφυγή της συσσωμάτωσης των κυττάρων που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους. Ο δεύτερος στόχος ήταν η παραγωγή ομοιογενούς μορφής SR-BI όπου όλα τα μόρια έχουν την ίδια ομοιόμορφη γλυκοζυλίωση.

Για την επίτευξη του πρώτου στόχου κατασκευάστηκε μια νέα κυτταρική σειρά HEK293SGnTI$^-$TetR στην οποία η έκφραση του SR-BI επετεύχθη με χρήση ενός επαγώμενου συστήματος έκφρασης που εξαρτάται από την παρουσία της τετρακυκλίνης. Για την κατασκευή αυτής της κυτταρικής σειράς έγινε κλωνοποίηση του cDNA του SR-BI πιο κάτω από δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες TetO (Tet Operator). Στις αλληλουχίες αυτές προσδένεται μια πρωτεΐνη-καταστολέας (TetR, Tet Repressor), η οποία κωδικοποιείται από ένα διαφορετικό πλασμίδιο, με το οποίο έχει διαμολυνθεί σταθερά η κυτταρική σειρά-στόχος (HEK293SGnTI$^-$TetR). Η πρόσδεση της πρωτεΐνης-καταστολέα εμποδίζει τη μεταγραφή και επομένως την έκφραση του SR-BI, που είναι κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού ($P_{CMV,}$ CMV Promoter). Η προσθήκη τετρακυκλίνης εκτοπίζει τον TetR από τη θέση πρόσδεσής του στο TetO και επιτρέπει την έκφραση του SR-BI όταν τα κύτταρα HEK293SGnTI$^-$TetR έχουν αυξηθεί σε ικανοποιητικό επίπεδο μέσα στο βιοαντιδραστήρα.

Η χρήση της κυτταρικής σειράς (HEK293SGnTI$^-$TetR) έδωσε επίσης λύση και στο δεύτερο πρόβλημα που ήταν η παραγωγή ομοιόμορφα γλυκοζυλιωμένου SR-BI. Η σειρά HEK293SGnTI$^-$TetR είναι μεταλλαγμένη ως προς το γονίδιο GnTI (N-acetyl Glucosaminyl Transferase I). Το ένζυμο που κωδικοποιείται από το GnTI συμμετέχει

στο μονοπάτι γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα στο σύστημα Golgi. Απουσία του ενζύμου GnTI, η γλυκοζυλίωση διακόπτεται και οι γλυκάνες που φέρουν οι πρωτεΐνες έχουν όλες την απλή μορφή υψηλής μανόζης, $GlcNAc(Man)_5$. Οι σύμπλοκες μορφές δεν σχηματίζονται. Μ'αυτό τον τρόπο γλυκοζυλίωση του SR-BI που πραγματοποιείται στα κύτταρα HEK είναι περιορισμένη και ομοιογενής και αυτό δημιουργεί ευνοϊκές προϋποθέσεις για τη διαδικασία της κρυστάλλωσης. Τέλος, η HEK293SGnTI⁻TetR είναι μια ευκαρυωτική κυτταρική σειρά που μπορεί να πραγματοποιεί όλες τις άλλες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την έκφραση και τον καθαρισμό και άλλων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, όπως η ροδοψίνη (206, 207).

Θα μπορούσε πιθανώς να έχει χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά ένα προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης του SR-BI. Σίγουρα, οι προκαρυωτικοί οργανισμοί καλλιεργούνται ευκολότερα και διαιρούνται ταχύτερα από τους ευκαρυωτικούς και αυτό οδηγεί δυνητικά σε υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικής έφρασης, ταχύτερα. Ένα τέτοιο σύστημα έκφρασης θα πρέπει βέβαια να προσεγγιστεί με την επιφύλαξη ότι πολλές φορές οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες δεν αναδιπλώνονται ορθά, συσσωματώνονται και επομένως είναι μη-λειτουργικές. Επιπλέον, τα συστήματα αυτά δεν έχουν την ικανότητα πραγματοποίησης μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων όπως η γλυκοζυλίωση, οι οποία κάποιες φορές είναι κρίσιμη για τη σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση.

Η έκφραση του SR-BI στην HEK293SGnTI⁻TetR επιβεβαιώθηκε με ανάλυση Western και με τη δοκιμασία πρόσληψης της φθορίζουσας ένωσης DiI από την HDL, με την οποία είναι συνεζευγμένη (DiI-HDL). Ακολούθησε η απομόνωση (καθαρισμός) του SR-BI σε μικρή κλίμακα, με χρήση χρωματογραφίας ανοσοσυγγενείας, στην οποία το μονοκλωνικό αντίσωμα. 1D4 έχει συνδεθεί ομοιοπολικά στη σεφαρόζη (CNBr Sepharose). Ο καθαρισμός βασίστηκε στην πρόσδεση του SR-BI-t1, που βρίσκεται στο κυτταρικό εκχύλισμα. Ο επίτοπος t1 είναι ένα εννεαπεπτίδιο (TETSQVAPA) που περιέχει τα εννέα καρβοξυτελικά αμινοξέα της ροδοψίνης και έχει προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο του SR-BI με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Το αντίσωμα 1D4 είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο

παρήχθη σε κυτταρική σειρά υβριδώματος που αναγνωρίζει τον επίτοπο TETSQVAPA. Η πρόσδεση του SR-BI στη ρεζίνη σεφαρόζης CNBr ακολουθείται από την έκλουσή του, η οποία πραγματοποιείται με προσθήκη του εννεαπεπτιδίου TETSQVAPA σε περίσσεια. Το πεπτίδιο ανταγωνίζεται την πρόσδεση του SR-BI-t1 στη ρεζίνη σεφαρόζης CNBr. Η απομόνωση του SR-BI επιβεβαιώθηκε με ανάλυση SDS-PAGE και εντοπισμό των ζωνών της καθαρής πρωτεΐνης με χρώση αργύρου.

Μετά τον καθαρισμό του SR-BI σε μικρή κλίμακα, έγινε επιβεβαίωση των ιδιοτήτων γλυκοζυλίωσής του μέσω πέψης με τα ένζυμα EndoH (Endoglycosidase H, ενδογλυκοζιδάση Η) και PNGase F. Το PNGase F πέπτει όλες τις γλυκάνες (υψηλής μανόζης και σύμπλοκες) και παράγει πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 54kDa, όπως προβλέπεται από την αμινοξική του ακολουθία (χωρίς, δηλαδή, γλυκάνες). Η EndoH πέπτει μόνο τις υψηλής μανόζης γλυκάνες. Καθώς το σύστημαέκφρασης του SR-BI που χρησιμοποιήθηκε προβλέπει την παραγωγή μόνο υψηλής μανόζης γλυκανών, η EndoH θα πρέπει να πέψει όλες τις γλυκάνες του SR-BI και να παραγάγει επίσης πρωτεΐνες μοριακού βάρους ~54kDa. Η ανάλυση Western που ακολούθησε τις πέψεις αυτές επιβεβαίωσε την παραγωγή SR-BI μοριακού βάρους 54kDa, όπως είχε προβλεφθεί.

Ακολούθησε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς HEK293SGnTI¯TetR σε βιοαντιδραστήρα CELLIGEN PLUS. Ο βιοαντιδραστήρας αυτός πραγματοποιεί δυναμικό έλεγχο της θερμακρασίας, του pH της καλλιέργειας και της περιεκτικότητάς της σε οξυγόνο, άζωτο, διοξείδιο του άνθρακα και αέρα στο θάλαμο καλλιέργειας των κυττάρων. Μ'αυτό τον τρόπο, διατηρεί βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και επέτρεψε στην παραγωγή καλλιεργειών υψηλής κυτταρικής πυκνότητας (5 X 10^6 κύτταρα/ml καλλιέργειας, συνολικός όγκος καλλιέργειας 5.5L).

Είναι σημαντικό ότι η επαγωγή της έκφρασης του SR-BI με τετρακυκλίνη, οδήγησε σε μικροσκοπικά εμφανή συσσωμάτωση των κυττάρων. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαίωσε την υποψία ότι η συσσωμάτωση που παρατηρήθηκε στο παρελθόν σε κύτταρα HEK293S σε καλλιέργεια, που εξέφραζαν ιδιοσυστασιακά (constitutively) τον SR-BI, οφείλεται στην έκφραση του υποδοχέα και πιθανώς σχετίζεται με τα ιδιαίτερα τοπολογικά του

χαρακτηριστικά (μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, κλπ.). Φυσικά η συσσωμάτωση αυτή, εφόσον είχε επιτευχθεί ήδη η μέγιστη κυτταρική πυκνότητα, δεν επηρέασε σημαντικά την περιεκτικότητα της καλλιέργειας σε SR-BI.

Το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε από τις καλλιέργειες αυτές υπεβλήθη σε χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας και τελικά, από κάθε καλλιέργεια 5.5L παρήχθησαν 5-8 mg καθαρής πρωτεΐνης. Μέρος αυτής της πρωτεΐνης ενσωματώθηκε σε λιποσώματα κατεξοχήν φωσφατιδυλχολίνης και χοληστερόλης. Τα πρωτεολιποσώματα αυτά υπεβλήθησαν στη συνέχεια σε ανάλυση πρόσδεσης σε φίλτρα (filter binding assay). Σε αυτή την ανάλυση, τα πρωτεολιποσώματα επωάζονται με ραδιοσημασμένες λιποπρωτεΐνες και εν συνεχεία διηθούνται σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης, των οποίων μετράται τελικά η ραδιενέργεια. Η ανάλυση αυτή επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας των λιποπρωτεϊνών που προσδένονται στα πρωτεολιποσώματα ή των εστέρων της χοληστερόλης που προσλαμβάνονται από αυτά, μέσω του SR-BI.

Έτσι φάνηκε ότι η καθαρή μεταλλαγμένη (ως προς το βαθμό γλυκοζυλίωσής της) πρωτεΐνη mSR-BI-t1 είναι λειτουργική, ότι προσδένει την ^{125}I-HDL και προσλαμβάνει τους αιθέρες της χοληστερόλης από την [^{3}H]-CE-HDL και μάλιστα σε επίπεδα παρόμοια με την αγρίου τύπου mSR-BI-t1 που δεν έχει υποστεί τροποποίηση στη γλυκοζυλίωσή της. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα ανάλυσης πρόσδεσης κορεσμού της ^{125}I-HDL που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα που εκφράζουν τις δύο μορφές του mSR-BI-t1. Επιπλέον, δείχθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ στο ρυθμιστικό διάλυμα επώασης των πρωτεολιποσωμάτων με τη ραδιοσημασμένη HDL οδηγεί σε αύξηση της πρόσδεσης της HDL, αλλά όχι και της πρόσληψης των αιθέρων χοληστερόλης από αυτήν. Είναι σημαντικό ότι η πρόσδεση τόσο της HDL όσο και της LDL είναι μέγιστη στους 37°C ενώ η πρόσληψη των εστέρων χοληστερόλης από αυτές αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα ευρήματα ήταν η αύξηση της πρόσδεσης της HDL με τη μείωση της τιμής του pH, η οποία δεν συνοδεύεται από μεταβολή της πρόσληψης των αιθέρων χοληστερόλης από αυτήν. Έγινε επίσης φανερό ότι η προσθήκη σφιγγομυελίνης στα λιποσώματα σε αυξανόμενη

αναλογία αυξάνει την πρόσληψη των αιθέρων χοληστερόλης από την HDL ενώ δεν μεταβάλλει σημαντικά την πρόσδεση της ^{125}I-HDL.

Σε άλλα πειράματα έγινε ανάλυση πρόσδεσης και πρόσληψης αιθέρων χοληστερόλης από τα πρωτεολιποσώματα παρουσία χημικών ενώσεων (BLT-1, 2, 3, 4 και 5) που αναστέλλουν τη μεταφορά λιπιδίων από την HDL. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι στόχος των χημικών αυτών ενώσεων είναι ο SR-BI. Τα πειράματα εστιάστηκαν στην ένωση BLT-1, η οποία ανήκει στην οικογένεια των θειοημικαρβαζών (thiosemicarbazone). Έτσι, ευρέθη ότι το άτομο θείου του BLT-1 είναι σημαντικό για την ανασταλτική του δράση, καθώς η μετατροπή του σε άτομο οξυγόνου οδηγεί σε ανενεργό ισομορφή του. Επιπλέον δείχθηκε η σημασία της υδρόφοβης ουράς του BLT-1 στη δράση του. Αναμένεται η περαιτέρω χρήση των BLT σε διάφορα πειραματικά μοντέλα να οδηγήσει στη διαλεύκανση του ρόλου του SR-BI στην επιλεκτική πρόσληψη λιπιδίων (120). Άλλα ευρήματα της μελέτης του SR-BI ενσωματωμένου σε λιποσώματα, οδήγησαν σε παρατηρήσεις και ιδέες για το ρόλο του SR-BI σε διάφορα κύτταρα και ιστούς. Κάποιες από τις σκέψεις και ιδέες αυτές για το φυσιολογικό ρόλο του SR-BI σε διάφορα κύτταρα και ιστούς αναπτύσσονται κατωτέρω και ενδέχεται να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.

Το υπόλοιπο της πρωτεΐνης που καθαρίστηκε με χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας, υπεβλήθη σε περαιτέρω καθαρισμό με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής στο εργαστήριο του Καθηγητή Robert Stroud στο University of California San Francisco. Στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών κατά τη διέλευσή τους από τη στήλη γίνεται με βάση το μέγεθός τους. Τα σωματίδια που έχουν ίδιο μέγεθος, θεωρητικά αναμένεται να εκλουσθούν μαζί. Στην πραγματικότητα, τα πρωτεϊνικά μόρια σε ένα διάλυμα δεν έχουν σταθερό μέγεθος, το οποίο οδηγεί στο φαινόμενο, ένα μόριο το οποίο σε κάποιες περιπτώσεις θα κατεκρατείτο από έναν πόρο, σε άλλες να μην κατακρατείται. Επιπλέον, τα σωματίδια της στατικής φάσης της στήλης δεν είναι τέλεια κατασκευασμένα. Τόσο τα ίδια τα σωματίδια όσο και οι πόροι που φέρουν, μπορεί να διαφέρουν σε μέγεθος. Για τους λόγους αυτούς, οι καμπύλες έκλουσης από τις στήλες μοριακής διήθησης μοιάζουν

με κατανομές τύπου Gauss. Πάντως, μια μοναδική καμπύλη τύπου Gauss δεν αποδεικνύει ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος και παρομοίως, μια ευρεία, σύμπλοκη καμπύλη δεν αποδεικνύει κατ'ανάγκη ετερογένεια. Παρόλα αυτά, μια μοναδική καμπύλη τύπου Gauss, όπως αυτές που εμφανίζονται στις εικόνες 31-59, μπορεί να είναι πολύ καλή ένδειξη ομοιογένειας, ειδικά αν το δείγμα εμφανίζεται ως μία ζώνη σε SDS-PAGE, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του mSR-BI-t1 (Εικ. 11). Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης έχει επίσης μειονεκτήματα, όπως ο μικρός αρχικός όγκος δείγματος που μπορεί να διαχωριστεί, ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση και οι ευρείες ζώνες έκλουσης μιας πρωτεΐνης στο χρωματογράφημα. Σε μερικές περιπτώσεις, η στατική φάση ενδέχεται να αλληλεπιδρά με τις υπό ανάλυση πρωτεΐνες και να επηρεάζεται έτσι ο χρόνος κατακράτησής τους. Έτσι, ο χρόνος κατακράτησης των πρωτεϊνών δεν αντανακλά πάντοτε το μέγεθός τους. Η χρωματογραφική αυτή ανάλυση του SR-BI έγινε εκ παραλλήλου με την προαναφερθείσα δοκιμασία των πρωτεολιποσωμάτων προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον καθαρισμό του υποδοχέα. Στην παρούσα μελέτη, η χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, ανιοντοανταλλαγής ή ανοσοσυγγενείας, δεν αλλοίωσε τη βιολογική δραστικότητα των δειγμάτων του SR-BI. Η χρωματογραφική αυτή ανάλυση έδειξε ότι τα δείγματα του SR-BI που προέκυψαν από τη χρωματογραφία ανοσοσυγγενείας είχαν εξαιρετική ομοιογένειας. Αυτό επέτρεψε την εκτίμηση της επίδρασης διαφόρων παραγόντων όπως το pH, αναγωγικών παραγόντων όπως το DTT (διθειοθρεϊτόλη) και της θερμοκρασίας στη σταθερότητα των δειγμάτων και στον ολιγομερισμό τους. Η μελέτη των ιδιοτήτων του καθαρού SR-BI επέτρεψε την παραγωγή κρυστάλλων SR-BI οι οποίοι υποβάλλονται σε ανάλυση με τη χρήση ακτίνων Χ, προκειμένου να διαλευκανθεί η δομή του SR-BI.

Οι κρύσταλλοι αυτοί μέχρι στιγμής δεν παρουσιάζουν σκέδαση των ακτίνων Χ. Οι πιθανοί λόγοι γι'αυτό είναι πολλοί. Κατ' αρχάς, η πιθανότητα σκέδασης αυξάνεται με την αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων. Συνήθως, είναι καλό οι κρύσταλλοι να έχουν ελάχιστο μέγεθος 100 μm σε όλες τις διαστάσεις τους, ενώ οι κρύσταλλοι του SR-BI έχουν μέγιστη διάσταση 70μm. Βεβαίως, είναι δυνατό οι κρύσταλλοι αυτοί να μεταφερθούν σε νέο διάλυμα, διαφορετικής σύστασης, το οποίο θα ευνοήσει την αύξηση του μεγέθους τους. Κατά δεύτερο λόγο, τα δείγματα του SR-BI, ενώ παρουσιάζουν

μεγάλη καθαρότητα και ομοιογένεια, όπως φαίνεται από τη χρωματογραφική τους ανάλυση, πάντως φαίνεται να αποτελούνται από πληθυσμό διαφόρων μορίων. Η διαφορά των μορίων αυτών, ίσως έγκειται σε διαφορά στο βαθμό γλυκοζυλίωσής τους. Βεβαίως, το σύστημα γλυκοζυλίωσης που χρησιμοποιήθηκε αναμένεται να σταματά το μονοπάτι γλυκοζυλίωσης αμέσως πριν τη δράση του ενζύμου N-ακετυλ-γλυκοζαμινυλ-τρανσφεράση I, όμως η διαδικασία της γλυκοζυλίωσης πριν από το βήμα αυτό, εξαρτάται επίσης από τη στερεοτακτική διαθεσιμότητα καθενός των 11 θέσεων γλυκοζυλίωσης, η οποία μπορεί να μην είναι πάντοτε ίδια. Μία λύση στο πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να είναι η παραγωγή πρωτεΐνης χωρίς καθόλου N-γλυκοζυλίωση, η οποία είναι δυνατή μέσω της χρήσης της χημικής ένωσης τουνικαμυκίνη (tunicamycin). Μάλιστα, θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο στην περίπτωση αυτή, το γεγονός ότι για την έκφραση του SR-BI χρησιμοποιήθηκε σύστημα TET-ON, καθώς το ίδιο αυτό σύστημα θα μπορούσε να χρησιμεύσει για την υπερσκέλιση πιθανής κυτταρο-τοξικότητας της τουνικαμυκίνης. Τέλος, τα δείγματα και οι κρύσταλλοι του SR-BI περιλαμβάνουν το απορρυπαντικό octyl glucoside, το οποίο ασφαλώς μειώνει την καθαρότητά τους και για το λόγο αυτό ίσως εμποδίζει τη σκέδαση των ακτίνων X. Έγιναν εκτεταμένες προσπάθειες, όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να μειωθεί η συγκέντρωση του απορρυπαντικού στα δείγματα του SR-BI. Ίσως θα ήταν χρήσιμο να επιμείνει κανείς περισσότερο στην προσπάθεια αυτή, ίσως με επιπλέον κύκλους διύλισης και χρωματογραφίας των πρωτεϊνικών δειγμάτων, λαμβάνοντας βέβαια υπ'όψιν ότι τα δείγματα μεμβρανικών πρωτεϊνών εξαρτώνται από την παρουσία απορρυπαντικού για τη διατήρηση της ακεραιότητας της δομής τους και επομένως της λειτουργικότητάς τους. Αν όλες οι παραπάνω τροποποιήσεις δεν οδηγήσουν στη σκέδαση των ακτίνων X, πιθανώς θα είχε αξία να επαναλάβει κανείς τη διαδικασία της κρυστάλλωσης με ελαφρώς τροποποιημένες, γενετικά, «εκδοχές» του υποδοχέα.

1. Μελέτη των Ιδιοτήτων του SR-BI in vitro και ο Φυσιολογικός του Ρόλος

- **Η Επίδραση του pH στις Ιδιότητες του SR-BI**

Η μελέτη των ιδιοτήτων του SR-BI που έχει ενσωματωθεί σε λιποσώματα έδωσαν σημαντικές πληροφορίες που ενδέχεται να σχετίζονται με τις φυσιολογικές του λειτουργίες. Έτσι φάνηκε ότι η πρόσδεση της ^{125}I-HDL σε πρωτεολιποσώματα χοληστερόλης/ φωσφατιδυλχολίνης/ mSR-BI-t1 αυξάνεται, καθώς μειώνεται η τιμή pH του ρυθμιστικού διαλύματος όπου γίνεται η επώαση των πρωτεολιποσωμάτων με την ^{125}I-HDL. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να συσχετιστεί με την παρατήρηση που δείχνει ότι καθαρισμός του SR-BI με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε pH 6 αυξάνει τον ολιγομερισμό του υποδοχέα, καθώς και με άλλες παρατηρήσεις για ολιγομερισμό του υποδοχέα (171, 172). Οι παρατηρήσεις αυτές στηρίζονται σε ανάλυση του SR-BI με HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) και PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) και δείχνουν το σχηματισμό συμπλεγμάτων, διμερών και τετραμερών του SR-BI. Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο διμερισμός του SR-BI σε χαμηλό pH ενδέχεται να διευκολύνει την πρόσδεση του συνδέτη του, που είναι η HDL

Στους ανώτερους οργανισμούς, η μείωση του pH (ή οξέωση), συνοδεύει διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η νεφρική και επινεφριδιακή ανεπάρκεια, η διαβητική κετοοξέωση, η χορήγηση σαλικυλικών, η σηψαιμία κλπ. Τίθεται το ερώτημα αν υπάρχει αυξημένη πρόσδεση της HDL στον SR-BI στις καταστάσεις αυτές και ποιός θα μπορούσε να είναι ο φυσιολογικός ρόλος αυτού του φαινομένου; Το φαινόμενο αυτό γενικεύεται και σε άλλους προσδέτες του SR-BI, πλην της HDL; Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι ο SR-BI στον άνθρωπο προσδένει τους λιποπολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (211). Θα μπορούσε η πρόσδεση αυτή να βελτιώνεται στις συνθήκες οξέωσης που συνοδεύουν συχνά τη σηψαιμία (βαρειά βακτηριαιμία); Είναι δυνατόν η αυξημένη πρόσδεση της HDL και άλλων συνδετών στον SR-BI να πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια που να συμβάλλουν στην αντιφλεγμονώδη δράση της HDL (212-217).

Στον άνθρωπο, η οξέωση προκαλεί επίσης μειωμένη πρόσδεση του ασβεστίου του πλάσματος στην αλβουμίνη του πλάσματος και συνεπώς αυξάνει την ποσότητα του ενεργού ασβεστίου στο αίμα. Είναι ενδιαφέρον ότι η μελέτη των ιδιοτήτων του SR-BI

ενσωματωμένου σε λιποσώματα έδειξε πως και η αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου του ρυθμιστικού διαλύματος επώασης, οδηγεί σε αυξημένη πρόσδεση της ^{125}I-HDL.

Από τα παραπάνω φάνηκε ότι τα αποτελέσματα της in vitro μελέτης της δράσης του SR-BI, ενσωματωμένου σε λιποσώματα μπορούν να συσχετιστούν με πιθανές φυσιολογικές λειτουργίες του SR-BI in vivo. Πιο άμεση γνώση για τη φυσιολογική δράση του SR-BI έχει προκύψει από τη μελέτη ποντικών με έλλειψη, είτε μόνο για το γονίδιο SR-BI ή διπλή έλλειψη των γονιδίων του SR-BI και apoE (double knockout mice, dKO).

Τα πειραματόζωα αυτά παρουσιάζουν πολυσυστηματική παθολογία, αλλά κυρίως βαρειά αποφρακτική αθηροσκλήρωση που συνοδεύεται από ισχαιμική καρδιοπάθεια (179-184). Τα παρακάτω αποτελούν σκέψεις πάνω στην παθολογία αυτών των ποντικών και στα πιθανά πειράματα και μελέτες για τα οποία αυτά προσφέρονται.

2. Συσχετισμός των Γνωστών Λειτουργιών του SR-BI με την Παθοφυσιολογία Ποντικών knockout για το Γονίδιο SR-BI ή για τα Γονίδια των SR-BI και apoE (dKO)

- SR-BI και Επινεφρίδια

Η πρόσδεση της HDL στον SR-BI συμβάλλει στην επιλεκτική πρόσληψη εστέρων χοληστερόλης από το κύτταρο καθώς και την απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από το κύτταρο. Οι εστέρες χοληστερόλης που προσλαμβάνονται επιλεκτικά από τα επινεφρίδια μέσω του SR-BI χρησιμοποιούνται για σύνθεση στεροειδών ορμονών (199-204). Τα επινεφρίδα των τρωκτικών είναι τα όργανα όπου υπάρχει η υψηλότερη έκφραση του SR-BI ανά γραμμάριο ιστού (218, 219) και έχει δειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση έχει φυσιολογική σημασία όσον αφορά στην παραγωγή στεροειδών ορμονών, όπως η κορτιζόλη (199-204). Επομένως, η υποκορτιζολαιμία είναι πιθανή στα dKO ποντίκια και θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί με μέτρηση των επιπέδων κορτιζόλης πλάσματος. Αν αυτή όντως υπάρχει, μπορεί να προκαλέσει αύξηση στα

επίπεδα του καλίου πλάσματος, η οποία μπορεί να μετρηθεί άμεσα και να επιβεβαιωθεί και εμμέσως, καρδιογραφικά (ανύψωση κυμάτων Τ, διεύρυνση συμπλεγμάτων QRS κλπ). Αυτή μπορεί να προκαλέσει καρδιακές αρρυθμίες, οι οποίες μπορούν επίσης να παρατηρηθούν καρδιογραφικά. Η ηλεκτροκαρδιογραφική μελέτη των ποντικών είναι δυνατή και πραγματοποιείται με μόνιμη εμφύτευση ηλεκτροκαρδιογραφικών απαγωγών σε αυτά (220). Η υποκορτιζολαιμία μπορεί να προκαλέσει επίσης διαταραχές στον εξωκυττάριο όγκο (του αίματος) των ποντικών. Οι επιπτώσεις αυτές της υποκορτιζολαιμίας θα μπορούσαν να επιβαρύνουν την καρδιακή παθολογία των dKO ποντικών. Τέλος, πιθανή επινεφριδιακή ανεπάρκεια θα μπορούσε να συνοδεύεται από μείωση της μυικής τους μάζας και υπογλυκαιμία, τα οποία θα μπορούσαν επίσης να παρατηρηθούν ή/και να μετρηθούν. Οι μετρήσεις αυτές δεν έχουν γίνει μέχρι στιγμής σε ποντίκια dKO για τα γονίδια του SR-BI και apoE.

- **Πιθανός Ρόλος του SR-BI στην Πήξη του Αίματος**

Χαμηλά επίπεδα HDL έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης (221). Έχει επίσης αναφερθεί ότι ασθενείς με θρομβοεμβολική νόσο έχουν χαμηλά επίπεδα HDL και μεγάλα σωμάτια HDL (221). Επιπλέον, δείχθηκε ότι ανεπάρκεια SR-BI οδηγεί στο σχηματισμό μεγάλων σωματίων HDL, με ανώμαλη λιπιδική και απολιποπρωτεϊνική σύσταση (198).

Η βιταμίνη Κ (όπως και οι βιταμίνες Α, D και Ε), είναι λιποδιαλυτή και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος. Είναι γνωστό ότι ο μηχανισμός της επιλεκτικής μεταφοράς χοληστερόλης είναι σημαντικός για τη μεταφορά βιταμίνης Ε στους ιστούς (222, 223). Συνεπώς τα dKO ποντίκια μπορεί να έχουν ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε. Δεν είναι γνωστό αν αυτό ισχύει και για τις άλλες λιποδιαλυτές βιταμίνες; Θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί εάν τα dKO ποντίκια έχουν διαταραχές στην πήξη του αίματος, σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, με μέτρηση/παρακολούθηση παραμέτρων όπως ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης κλπ. Τέλος, αν είναι ανώμαλη η μεταφορά και των βιταμινών Α ή D, αυτό θα μπορούσε να διερευνηθεί με ιστοπαθολογική εξέταση των οφθαλμών και των οστών, αντιστοίχως.

- **Πιθανός Ρόλος του SR-BI στο Μυικό Σύστημα**

Προαναφέρθηκε ότι τα dKO ποντίκια μπορεί να έχουν μυοπάθεια συνεπεία πιθανής επινεφριδιακής ανεπάρκειας, καθώς και ανεπάρκειας της βιταμίνης Ε. Είναι γνωστό ότι η βιταμίνη Ε είναι απαραίτητη για τη μυική ανάπτυξη στον άνθρωπο. Πρώιμα βρέφη με ανεπάρκεια βιταμίνης Ε έχουν μυική αδυναμία με κηροειδή χρώση και νέκρωση του μυικού ιστού (224, 225). Επιπλέον, η ανεπάρκεια βιταμίνης Ε έχει συνδεθεί σε ορισμένες περιπτώσεις και με καρδιομυοπάθεια. Στα ποντίκια έχει παρατηρηθεί ότι ανεπάρκεια του SR-BI συνδέεται με μείωση του κλάσματος εξώθησης (fractional shortening) και άλλες καρδιακές ανωμαλίες. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε, αν υπάρχει στα dKO ποντίκια, θα μπορούσε να επιτείνει την καρδιακή τους παθολογία. Θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει ιστοπαθολογική εξέταση του μυικού ιστού των dKO ποντικών για τη διαπίστωση αλλοιώσεων συμβατών με ανεπάρκεια βιταμίνης Ε.

- **Ρόλος του SR-BI στην Ομαλή Λειτουργία του Καρδιαγγειακού Συστήματος**

Όπως προαναφέρθηκε, τα dKO ποντίκια έχουν βαρειά αθηρωματική ισχαιμική καρδιοπάθεια και πιθανώς αναπτύσσουν καρδιακή ανεπάρκεια και καρδιογενές σοκ, τα οποία ίσως να είναι και η αιτία του προώρου θανάτου τους. Αποκαλυπτική στη διερεύνηση του ρόλου του SR-BI στη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος ήταν και η ανάπτυξη ενός διαγονιδιακού μοντέλου ποντικού με αποφρακτική αθηρωμάτωση προκαλούμενη από δίαιτα υψηλή σε λιπίδια. Το μοντέλο αυτό προέκυψε από τη διασταύρωση ποντικού με έλλειψη για το γονίδιο του SR-BI ($SR\text{-}BI^{-/-}$), με διαγονιδιακό ποντικό που φέρει μετάλλαξη (T61R) στο γονίδιο της apoE (220). Τα ποντίκια αυτά έχουν πολυσυστηματική παθολογία, η οποία πιθανώς επιτείνει την καρδιακή τους παθολογία. Αυτό συζητήθηκε πιο πάνω σε συνάρτηση π.χ. με την πιθανή υποκορτιζολαιμία των ποντικών αυτών. Επίσης, η ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε που πιθανώς έχουν, μπορεί να προκαλέσει διαταραχή της διαπερατότητας των τριχοειδών τους αγγείων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή του ισοζυγίου ύδατος και να επιτείνει την καρδιακή τους ανεπάρκεια. Η αιτιακή συσχέτιση της ανεπάρκειας της

βιταμίνης Ε με την καρδιακή παθολογία υποστηρίζεται και από την καρδιομυοπάθεια με τις θανατηφόρους αρρυθμίες, που αναπτύσσουν ασθενείς με αβηταλιποπρωτειναιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από βαρειά ανεπάρκεια βιταμίνης Ε (226).

- **SR-BI και Νεφρική Λειτουργία**

Δύο βασικοί λόγοι για τους οποίους τα dKO ποντίκια θα μπορούσαν να έχουν νεφρικές βλάβες είναι η αθηροσκλήρυνση των νεφρικών τους αρτηριών και η πιθανή ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε, η οποία έχει συσχετιστεί, εκτός των άλλων, με νεφρική βλάβη και κρεατινουρία στον άνθρωπο (227). Παρατεταμένη αύξηση της κρεατινίνης του αίματος είναι ειδική για τη διάγνωση νεφρικής δυσλειτουργίας και θα μπορούσε να μετρηθεί στα dKO ποντίκια. Επίσης θα μπορούσε να γίνει απευθείας ιστοπαθολογική εξέταση των νεφρών των ποντικών αυτών. Η νεφρική δυσλειτουργία/ανεπάρκεια, αν υπάρχει, θα μπορούσε, εξαιτίας των διαταραχών που προκαλεί στους ηλεκτρολυτες και το ισοζύγιο ύδατος, να επιτείνει επίσης την ήδη βαρειά καρδιακή παθολογία των dKO ποντικών. Προκαταρκτικά πειράματα στα SR-BI ποντίκια δεν έδειξαν αύξηση της κρεατινίνης του πλάσματος.

- **Ρόλος του SR-BI στην Ωρίμανση των Ερυθροκυττάρων**

Τα dKO ποντίκια έχουν ανώμαλα ερυθρά αιμοσφαίρια και αναιμία, ευρήματα που φαίνεται ότι σχετίζονται αιτιακά με το υψηλό περιεχόμενο των ερυθροκυττάρων σε χοληστερόλη (196). Ανωμαλίες των ερυθροκυττάρων έχουν παρατηρηθεί σε συνδυασμό και με άλλες διαταραχές των λιποπρωτεϊνών, όπως η ανεπάρκεια LCAT (228). Στην περίπτωση των dKO SR-BI ποντικών, η αναιμία θα μπορούσε να επιταθεί από την πιθανή διαταραχή στην παραγωγή της ερυθροποιητίνης. Επιπλέον, η πιθανή ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε στα dKO ποντίκια μπορεί να έχει επιπτώσεις στην αιμοποίηση. Στην αβηταλιποπρωτεϊναιμία, για παράδειγμα, όπου υπάρχει βαρειά ανεπάρκεια βιταμίνης Ε, παρατηρείται ακανθοκυττάρωση (229, 230). Επίσης, η ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε έχει συνδεθεί με ανωμαλίες του μυελού των οστών (231) . Όμως και η ίδια η αναιμία μπορεί να προκαλέσει δευτεροπαθείς βλάβες, όπως, π.χ. ιστική υποξία και αντιρροπιστική

αύξηση του όγκου παλμού των dKO ποντικών και να επιτείνει έτσι την καρδιακή ανεπάρκεια των εν λόγω πειραματοζώων. Ενίοτε, βαρειά και παρατεταμένη αναιμία μπορεί να οδηγήσει επίσης σε λιπώδη διήθηση της καρδιάς. Θα ήταν επίσης ενδιαφέρον να εξεταστούν μακροσκοπικά καθώς και ιστοπαθολογικά το ήπαρ και ο σπλήνας (που μπορούν να λειτουργήσουν σε περίπτωση βαρειάς αναιμίας ως δευτερογενή αιμοποιητικά όργανα) των dKO ποντικών για τη διαπίστωση πιθανής δευτεροπαθούς ηπατομεγαλίας ή/και σπληνομεγαλίας. Οι εν λόγω παράμετροι δεν έχουν εξεταστεί σε SR-BI ποντίκια.

- **Βλάβη του SR-BI Συμβάλλει στην Υπογονιμότητα**

Τα θηλυκά SR-BI knockout ποντίκια έχουν μειωμένη γονιμότητα και ανώμαλα ωοκύτταρα, χωρίς να υπάρχει προφανής παθοφυσιολογικός μηχανισμός για αυτά τα ευρήματα (179). Είναι γνωστό ότι η FSH (Follicle Stimulating Hormone) εκκρίνεται από την υπόφυση και προάγει την ωογένεση. Παράλληλα η FSH αναστέλλεται από τα οιστρογόνα των ωοθηκών. Η φαρμακευτική ουσία κλομιφένη αναστέλλει αυτή την αρνητική ανάδραση των οιστρογόνων, δρώντας ως ανταγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνων στην υπόφυση. Η κλομιφένη είναι μία μη-στεροειδική ένωση που χρησιμεύει για την προαγωγή της ωορηξίας σε γυναίκες που έχουν σπάνια ή απούσα ωορηξία, όπως συμβαίνει στην περίπτωση γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Ο ρόλος των οιστρογόνων των ωοθηκών στη γονιμότητα των dKO ποντικών για SR-BI και apoE θα μπορούσε να μελετηθεί στο μέλλον με τη χορήγηση κλομιφένης στα dKO ποντίκια. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε έχει επίσης αρνητικές επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα του ανθρώπου (232). Δεδομένου ότι τα dKO ποντίκια έχουν μειωμένη επιλεκτική μεταφορά βιταμίνης Ε στα κύτταρα, αν η πρόσληψη της βιταμίνης Ε εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη λειτουργία του SR-BI, προβλέπεται η χορήγηση βιταμίνης Ε να μη διορθώσει την υπογονιμότητα των SR-BI KO ποντικών. Αντίθετα, στην περίπτωση της αβιταλιποπρωτεϊναιμίας, όπου λειτουργεί ο SR-BI, η χορήγηση βιταμίνης Ε έχει ευεργετικά αποτελέσματα. Με την ίδια λογική, αν η χορήγηση βιταμίνης Ε στα dKO ποντίκια με ανεπάρκεια για SR-BI και apoE διορθώσει την υπογεννητικότητα των εν λόγω πειραματοζώων, τότε θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε

ότι ο SR-BI πιθανόν να μην αποτελεί το κύριο μονοπάτι πρόσληψης βιταμίνης Ε από τα κύτταρα.

- **Ρόλος του SR-BI στη Λειτουργία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος**

Τα dKO ποντίκια, ως μέρος της βαρειάς αθηρωματικής τους νόσου, θα μπορούσαν να έχουν αθηρωμάτωση των εγκεφαλικών τους αγγείων. Στο χοίρο, επιπλέον, όπου ο υποδοχέας εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών του εγκεφάλου, έχει δειχθεί ότι ο SR-BI συνεισφέρει στην επιλεκτική πρόσληψη βιταμίνης Ε που συνδέεται με την HDL, στον εγκέφαλο (222). Η βιταμίνη Ε είναι απαραίτητη για τη συντήρηση των νευρώνων. Μάλιστα στην αβηταλιποπρωτεϊναιμία, που χαρακτηρίζεται από βαρειά ανεπάρκεια βιταμίνης Ε στον άνθρωπο, υπάρχουν εκσεσημασμένες νευρολογικές βλάβες (233). Χορήγηση μεγάλων δόσεων βιταμίνης Ε μπορεί να καθυστερήσει τις νευρολογικές εκδηλώσεις της αβηταλιποπρωτεϊναιμίας στον άνθρωπο (234, 235). Επιπλέον, πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η apoE συμμετέχει στο σχηματισμό HDL που περιέχει apoE. Μ'αυτό τον τρόπο η apoE μπορεί να συμβάλλει στην ομοιόσταση λιπιδίων, αλλά επίσης και στην επιλεκτική μεταφορά λιπιδίων στον εγκέφαλο. Δεν είναι γνωστό εάν υπάρχουν νευρολογικές βλάβες στα dKO ποντίκια. Υπάρχουν όμως μέθοδοι εξέτασης της νευρολογικής αρτιότητας ποντικών (καθώς και εταιρίες, όπως π.χ. η Psychogenics, οι οποίες αναλαμβάνουν τον έλεγχο αυτό).

- **Πιθανός Ρόλος του SR-BI στην Ομαλή Λειτουργία του Οφθαλμού**

Ο αμφιβληστροειδής είναι μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος, και μάλιστα το μόνο που μπορεί να εξεταστεί εξωτερικά στον άνθρωπο με το οφθαλμοσκόπιο. Αμφιβληστροειδοπάθεια υπάρχει σε διάφορες λιπιδικές διαταραχές, όπως η αβηταλιποπρωτεϊναιμία (236), καθώς και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις που συνοδεύονται από ανεπάρκεια βιταμίνης Ε. Η συμβολή δυσλειτουργίας του SR-BI στην ανάπτυξη της αμφιβληστροειδοπάθειας δεν έχει εξεταστεί. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους τα dKO ποντίκια θα μπορούσαν να έχουν κάποιου βαθμού αμφιβληστροειδοπάθεια. Τέτοιοι είναι π.χ. η πιθανή αθηρωματική μικροαγγειοπάθεια

των οφθαλμών τους και η πιθανή ανεπάρκεια βιταμίνης Ε. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι ο SR-BI έχει ειδική δράση στον αμφιβληστροειδή. Με RT-PCR, ανάλυση Western, *in situ* υβριδοποίηση και ανοσοϊστοχημική ανάλυση δείχθηκε ότι ο SR-BI εκφράζεται σε υψηλό επίπεδο σε διαφόρους νευρο-αμφιβληστροειδικούς και μη-νευρωνικούς κυτταρικούς τύπους του οφθαλμού του αρουραίου (237). Τα χρωμοφόρα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς του ανθρώπου εκφράζουν τους υποδοχείς-καθαριστές (scavenger receptors) SR-BI και SR-BII (238)

Είναι ενδιαφέρον ότι ένας τάξης Β υποδοχέας-καθαριστής της Drosophila πραγματοποιεί την κυτταρική πρόσληψη της βιταμίνης Α, και η απώλεια της δράσης του χαρακτηρίζεται από ανώμαλες οπτικές χρωμοφόρες ενώσεις και τύφλωση στη Drosophila (239). Τέλος, το γονίδιο ninaD κωδικοποιεί έναν τάξεως Β υποδοχέα-καθαριστή, που είναι απαραίτητος για το σχηματισμό οπτικών χρωμοφόρων (240). Για τους λόγους αυτούς, τα dKO ποντίκια θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν ιστολογικά για την ύπαρξη αμφιβληστροειδοπάθειας.

- **SR-BI και Φαρμακολογία**

Τα dKO ποντίκια προσφέρονται σαν μοντέλα πειραματοζώων για την αξιολόγηση της επίδρασης ή/και της αποτελεσματικότητας φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση καταστάσεων που συνοδεύονται από διαταραχές λιπιδίων αλλά γενικότερα και άλλων νοσημάτων που αντιστοιχούν στην πολυσυστηματική παθολογία των dKO ποντικών. Για παράδειγμα, αν τα dKO ποντίκια έχουν υποκορτιζολαιμία με πιθανές καρδιακές και άλλες επιπλοκές, αυτές θα μπορούσαν να αναστραφούν σε κάποιο βαθμό με χορήγηση στεροειδών (π.χ. υδροκορτιζόνης). Επίσης, υπάρχουν φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την άμεση και τη μακροχρόνια αντιμετώπιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου στον άνθρωπο. Δεδομένης της βαρειάς ισχαιμικής καρδιοπάθειας των dKO ποντικών, θα μπορούσαν να χορηγηθούν στα ποντίκια αυτά, π.χ. θρομβολυτικά φάρμακα ή β-αναστολείς και να εκτιμηθεί η επίδρασή τους με καταγραφή πιθανής μεταβολής στην επιβίωση των ποντικών και στο ηλεκτροκαρδιογράφημά τους.

Βιβλιογραφία

1. Calvo D, Dopazo J, Vega MA 1995 The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. Genomics 25:100–106.

2. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B 1989 CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. Cell 58:95–101.

3. Vega MA, Segui-Real B, Garcia JA, Cales C, Rodriguez F, Vanderkerckhove J, Sandoval IV 1991 Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. J Biol Chem 266:16818–16824.

4. Hart K, Wilcox M 1993 A Drosophila gene encoding an epithelial membrane protein with homology to CD36/LIMP II. J Mol Biol 234:249–253.

5. Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA 1996 Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. Immunity 4:431–443.

6. Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, White K 1999 Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. Science 284:1991–1994.

7. Rogers ME, Sun M, Lerner MR, Vogt RG 1997 Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. J Biol Chem 272:14792–14799.

8. Hirano K, Tsukamoto K, Zhongyan Z, Matsuyama A, Tsujji K, Shishio N, Yamashita S, Matsuzawa Y 2000 Macrophage-specific variant of human scavenger receptor class B type I (SR-BI), SR-BIII, has possible function to regulate direction of SR-BI-mediated cholesterol flux as an accessory protein. Circulation 102:II86.

9. Webb NR, de Villiers WJ, Connell PM, de Beer FC, van der Westhuyzen DR 1997 Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). J Lipid Res 38:1490–1495.

10. Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH 1997 Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. J Biol Chem 272:33068–33076.

11. Armesilla AL, Vega MA 1994 Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. J Biol Chem 269:18985–18991.

12. Calvo D, Vega MA 1993 Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. J Biol Chem 268:18929–18935.

13. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M 1996 Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271:518–520.

14. Vinals M, Xu S, Vasile E, Krieger M 2003 Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. J Biol Chem 278:5325–5332.

15. Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M 1997 Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. J Biol Chem 272:13242–13249.

16. Tao N, Wagner SJ, Lublin DM 1996 CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. J Biol Chem 271:22315–22320.

17. 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 273:26338–26348.

18. Webb NR, Connell PM, Graf GA, Smart EJ, de Villiers WJ, de Beer FC, van der Westhuyzen DR 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 273:15241–15248.

19. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M 1997 Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. Nature 387:414–417.

20. Stangl H, Graf GA, Yu L, Cao G, Wyne K 2002 Effect of estrogen on scavenger receptor BI expression in the rat. J Endocrinol 175:663–672.

21. Mardones P, Pilon A, Bouly M, Duran D, Nishimoto T, Arai H, Kozarsky KF, Altayo M, Miquel JF, Luc GV, Staels B, Rigotti A 2003 Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) protein expression in mice. J Biol Chem 278:7884–7890.

22. Burgos P, Klattenhoff C, Rigotti A, González A 1999 Polarized basolateral distribution of HDL receptor SR-BI is disrupted by cholesterol depletion. Mol Biol Cell 10S:A1763.

23. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR 2001 High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. J Biol Chem 276:25287–25293.

24. Cai SF, Kirby RJ, Howles PN, Hui DY 2001 Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. J Lipid Res 42:902–909.

25. Voshol PJ, Schwarz M, Rigotti A, Krieger M, Groen AK, Kuipers F 2001 Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. Biochem J 356:317–325.

26. Miquel JF, Moreno M, Santibañez E, Amigo L, Wistuba I, Acton S, Rigotti A 2000 Expression and regulation of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in human and murine gallbladder epithelial cells. Gastroenterology 188:A134.

27. Ikemoto M, Arai H, Feng D, Tanaka K, Aoki J, Dohmae N, Takio K, Adachi H, Tsujimoto M, Inoue K 2000 Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. Proc Natl Acad Sci USA 97:6538–6543.

28. Silver DL 2002 A carboxyl-terminal PDZ-interacting domain of scavenger receptor B, type I is essential for cell surface expression in liver. J Biol Chem 277:34042–34047.

29. 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 Lipidol 8:181–188.

30. Krieger M 1999 Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the HDL receptor SR-BI. Annu Rev Biochem 68:523–588.

31. Trigatti B, Rigotti A, Krieger M 2000 The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. Curr Opin Lipidol 11:123–131.

32. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M 1994 Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. J Biol Chem 269:21003–21009.

33. Gillotte-Taylor K, Boullier A, Witztum JL, Steinberg D, Quehenberger O 2001 Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. J Lipid Res 42:1474.

34. Marsche G, Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, Malle E 2002 Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I impairs high density lipoprotein-dependent selective lipid uptake and reverse cholesterol transport. J Biol Chem 277:32172–32179.

35. Krieger M 1992 Molecular flypaper and atherosclerosis: structure of the macrophage scavenger receptor. Trends Biochem Sci 17:141–146.

36. Fluiter K, Sattler W, De Beer MC, Connell PM, van der Westhuyzen DR, van Berkel TJ. Scavenger receptor BI mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. J Biol Chem. 1999 Mar 26; 274(13):8893-9.

37. Kodama T, Doi T, Suzuki H, Takahashi K, Wada Y, Gordon S 1996 Collagenous macrophage scavenger receptors. Curr Opin Lipidol 7:287–291.

38. Krieger M 1997 The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. Curr Opin Lipidol 8:275–280.

39. Greaves DR, Gough PJ, Gordon S 1998 Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence. Curr Opin Lipidol 9:425–432.

40. Steinberg D, Dhaliwal BS, Steinbrecher UP 1999 Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. Clin Chim Acta 286:191–205.

41. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H 2001 Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. J Biol Chem 276:13348–13355.

42. Rigotti A, Acton SL, Krieger M 1995 The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. J Biol Chem 270:16221–16224.

43. Fukasawa M, Adachi H, Hirota K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K 1996 SRB1, a class B scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells. Exp Cell Res 222:246–250.

44. Kawasaki Y, Nakagawa A, Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular sertoli cells. J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):27559-66.

45. Shiratsuchi A, Kawasaki Y, Ikemoto M, Arai H, Nakanishi Y 1999 Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. J Biol Chem 274:5901–5908.

46. Svensson PA, Johnson MS, Ling C, Carlsson LM, Billig H, Carlsson B 1999 Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: possible role in high density lipoprotein cholesterol uptake and in the recognition of apoptotic granulosa cells. Endocrinology 140:2494–2500.

47. Imachi H, Murao K, Hiramine C, Sayo Y, Sato M, Hosokawa H, Ishida T, Kodama T, Quehenberger O, Steinberg D, Takahara J 2000 Human scavenger receptor B1 is involved in recognition of apoptotic thymocytes by thymic nurse cells. Lab Invest 80:263–270.

48. Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR 1996 Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid ß-protein via a scavenger receptor. Neuron 17:553–565.

49. Husemann J, Loike JD, Kodama T, Silverstein SC 2001 Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar ß-amyloid. J Neuroimmunol 114:142–150.

50. Husemann J, Silverstein SC 2001 Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. Am J Pathol 158:825–832.

51. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A 2002 The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. EMBO J 21:5017–5025.

52. Gu X, Lawrence R, Krieger M 2000 Dissociation of the high density lipoprotein and low density lipoprotein binding activities of murine scavenger receptor class B type I (mSR-BI) using retrovirus library-based activity dissection. J Biol Chem 275:9120–9130.

53. Calvo D, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA, Vega MA 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 17:2341–2349.

54. Goldstein JL, Brown MS 1990 Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343:425–430.

55. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ 1985 Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Annu Rev Cell Biol 1:1–39.

56. Out R, Kruijt JK, Rensen PC, Hildebrand RB, de Vos P, Van Eck M, Van Berkel TJ. Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism. J Biol Chem. 2004 Apr 30;279(18):18401-6.

57. Pieters MN, Schouten D, Van Berkel TJ 1994 *In vitro* and *in vivo* evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport. Biochim Biophys Acta 1225:125–134.

58. Fidge NH 1999 High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. J Lipid Res 40:187–201.

59. Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH, Phillips MC 1991 Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. Biochem Biophys Acta 1085:273–298.

60. Assmann G, Schmitz G, Brewer HBJ 1995 Familial HDL deficiency: Tangier disease. In: Scriver CR, Beaudet AS, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2053–2072.

61. Brissette L, Noel SP 1986 The effects of human low and high density lipoproteins on the binding of rat intermediate density lipoproteins to rat liver membranes. J Biol Chem 261:6847–6852.

62. Krieger M, Herz J 1994 Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). Annu Rev Biochem 63:601–637.

63. Ashkenas J, Penman M, Vasile E, Acton S, Freeman M, Krieger M 1993 Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type I and type II macrophage scavenger receptors. J Lipid Res 34:983–1000.

64. Gu X, Kozarsky K, Krieger M 2000 Scavenger receptor, class B, type I-mediated [^{3}H]cholesterol efflux to high density and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. J Biol Chem 275:29993–30001.

65. Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateaux PN, Krieger JP, Kane J, Krieger M, Zannis VI 2000 Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect

of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. J Biol Chem 275:21262–21271.

66. de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Jonas A, de Beer FC, van der Westhuyzen DR 2001 Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. J Lipid Res 42:309–313.

67. Xu S, Laccotripe M, Huang X, Rigotti A, Zannis VI, Krieger M 1997 Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. J Lipid Res 38:1289–1298.

68. Li X, Kan HY, Lavrentiadou SN, Krieger M, Zannis VI 2002 Reconstituted discoidal ApoE-phospholipid particles are ligands for the scavenger receptor BI. The amino terminal 1–165 domain of ApoE suffices for receptor binding. J Biol Chem 277:21149–21157.

69. Liu T, Krieger M, Kan HY, Zannis VI 2002 The effects of mutations in helices 4 and 6 of apoA-I on SR-BI-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted HDL and SR-BI is required for efficient lipid transport. J Biol Chem 277:21576–21584.

70. Williams DL, de La Llera-Moya M, Thuahnai ST, Lund-Katz S, Connelly MA, Azhar S, Anantharamaiah GM, Phillips MC 2000 Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic α-helix as a recognition motif. J Biol Chem 275:18897–18904.

71. Pilon A, Briand O, Lestavel S, Copin C, Majd Z, Fruchart JC, Castro G, Clavey V 2000 Apolipoprotein AII enrichment of HDL enhances their affinity for class B type I scavenger receptor but inhibits specific cholesteryl ester uptake. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:1074–1081.

72. de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Mirocha N, Jonas A, Webb NR, de Beer FC, van Der Westhuyzen DR 2001 Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high density lipoprotein by scavenger receptor BI. J Biol Chem 276:15832–15839.

73. Gauster M, Oskolkova OV, Innerlohinger J, Glatter O, Knipping G, Frank S. 2004 Endothelial lipase-modified high-density lipoprotein exhibits diminished ability to mediate SR-BI (scavenger receptor B type I)-dependent free-cholesterol efflux. Biochem J. 382(Pt 1):75-82.

74. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR 1997 Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. J Biol Chem 272:20982–20985.

75. Jian B, de la Llera-Moya M, Ji Y, Wang N, Phillips MC, Swaney JB, Tall AR, Rothblat GH 1998 Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. J Biol Chem 273:5599–5606.

76. Stangl H, Hyatt M, Hobbs HH 1999 Transport of lipids from high and low density lipoproteins via scavenger receptor-BI. J Biol Chem 274:32692–32698.

77. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL, Tall AR 1999 Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. J Biol Chem 274:33398–33402.

78. Urban S, Zieseniss S, Werder M, Hauser H, Budzinski R, Engelmann B 2000 Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein associated phospholipids into the cells. J Biol Chem 275:33409–33341.

79. Greene DJ, Skeggs JW, Morton RE 2001 Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). J Biol Chem 276:4804–4811.

80. Goti D, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Frank S, van Der Westhuyzen DR, Malle E, Sattler W 2001 Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. J Neurochem 76:498–508.

81. Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, Quinones V, Amigo L, Rozowski J, Krieger M, Rigotti A 2002 α-Tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. J Nutr 132:443–449.

82. Reaven E, Leers-Sucheta S, Nomoto A, Azhar S 2001 Expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) promotes microvillar channel formation and selective cholesteryl ester transport in a heterologous reconstituted system. Proc Natl Acad Sci USA 98:1613–1618.

83. Thuahnai ST, Lund-Katz S, Williams DL, Phillips MC 2001 Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. J Biol Chem 276:43801–43808.

84. Temel RE, Trigatti B, DeMattos RB, Azhar S, Krieger M, Williams DL 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 USA 94:13600–13605.

85. Reaven E, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Temel R, Williams DL, 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 139:2847–2856.

86. Glass C, Pittman RC, Weinstein DB, Steinberg D 1983 Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. Proc Natl Acad Sci USA 80:5435–5439.

87. Stein Y, Dabach Y, Hollander G, Halperin G, Stein O 1983 Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether. Biochim Biophys Acta 752:98–105.

88. Glass C, Pittman RC, Civen M, Steinberg D 1985 Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat *in vivo* and by adrenal cells and hepatocytes *in vitro*. J Biol Chem 260:744–750.

89. Pittman RC, Steinberg D 1984 Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoproteins. J Lipid Res 25:1577–1585.

90. Knecht TP, Pittman RC 1989 A plasma membrane pool of cholesteryl esters that may mediate the selective uptake of cholesteryl esters from high-density lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1002:365–375.

91. Rnninger F, Jaeckle S, Pittman RC 1993 A pool of reversibly cell-associated cholesteryl esters involved in the selective uptake of cholesteryl esters from high-density lipoproteins by Hep G2 hepatoma cells. Biochim Biophys Acta 1166:275–283.

92. Pittman RC, Knecht TP, Rosenbaum MS, Taylor CAJ 1987 A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. J Biol Chem 262:2443–2450.

93. Sparrow CP, Pittman RC 1990 Cholesterol esters selectively taken up from high-density lipoproteins are hydrolyzed extralysosomally. Biochim Biophys Acta 1043:203–210.

94. LeLamatre JG, Carter RM, Hornick CA 1991 Evidence for extralysosomal hydrolysis of high-density lipoprotein cholesteryl esters in rat hepatoma cells (Fu5AH): a model for delivery of high-density lipoprotein cholesterol. J Cell Physiol 146:18–24.

95. DeLamatre JG, Carter RM, Hornick CA 1993 Evidence that a neutral cholesteryl ester hydrolase is responsible for the extralysosomal hydrolysis of high-density

lipoprotein cholesteryl ester in rat hepatoma cells (Fu5AH). J Cell Physiol 157:164–168.

96. Shimada A, Tamai T, Oida K, Takahashi S, Suzuki J, Nakai T, Miyabo S 1994 Increase in neutral cholesteryl ester hydrolase activity produced by extralysosomal hydrolysis of high-density lipoprotein cholesteryl esters in rat hepatoma cells (H-35). Biochim Biophys Acta 1215:126–132.

97. Reaven E, Tsai L, Azhar S 1996 Intracellular events in the "selective" transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters. J Biol Chem 271:16208–16217.

98. Leitersdorf E, Stein O, Eisenberg S, Stein Y 1984 Uptake of rat plasma HDL subfractions labeled with [^{3}H]cholesteryl linoleyl ether or with ^{125}I by cultured rat hepatocytes and adrenal cells. Biochim Biophys Acta 796:72–82.

99. Reaven E, Chen YD, Spicher M, Azhar S 1984 Morphological evidence that high density lipoproteins are not internalized by steroid producing cells during *in situ* organ perfusion. J Clin Invest 74:1384–1397.

100. Reaven E, Zhan L, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Azhar S 2000 Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. J Lipid Res 41:343–356.

101. Gwynne JT, Mahaffee DD 1989 Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. J Biol Chem 264:8141–8150.

102. Mckinnon M, Savage J, Wishart R, Barter P 1986 Metabolism of high density lipoproteins by the perfused rabbit liver. J Biol Chem 261:2548–2552.

103. Abeeny CM, Rifici VA, Eder HA 1987 The uptake of the apoprotein and cholesteryl ester of high-density lipoproteins by the perfused rat liver. Biochim Biophys Acta 917:9–17.

104. Brissette, L, Charest MC, Falstrault L, Lafond J, Rhainds D, Tremblay C, Truong TQ 1999 Selective uptake of cholesteryl esters from various classes of lipoproteins by HepG2 cells. Biochem Cell Biol 77:157–163.

105. Pittman RC, Glass CK, Atkinson D, Small DM 1987 Synthetic high density lipoprotein particles. Application to studies of the apoprotein specificity for selective uptake of cholesterol esters. J Biol Chem 262:2435–2442.

106. 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 1213:5–13.

107. Brissette L, Falstrault L, Lafond J, Izem L 1996 The selective uptake of the cholesteryl esters of low density lipoproteins parallels the activity of protein kinase C. Biochim Biophys Acta 1301:133–140.

108. Green SR, Pittman RC 1991 Selective uptake of cholesteryl esters from low density lipoproteins *in vitro* and *in vivo*. J Lipid Res 32:667–678.

109. Rinninger F, Brundert M, Jackle S, Kaiser T, Greten H 1995 Selective uptake of low-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human fibroblasts, human HepG2 hepatoma cells and J774 macrophages in culture. Biochim Biophys Acta 1255:141–153.

110. Swarnakar S, Temel RE, Connelly MA, Azhar S, Williams DL 1999 Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. J Biol Chem 274:29733–29739.

111. Stangl H, Cao G, Wyne KL, Hobbs HH 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 273:31002–31008.

112. Connelly MA, Klein SM, Azhar S, Abumrad NA, Williams DL 1999 Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. J Biol Chem 274:41–47.

113. Webb NR, de Beer MC, Yu J, Kindy MS, Daugherty A, van der Westhuyzen DR, de Beer FC 2002 Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice. J Lipid Res 43:1421–1428.

114. Rinninger F, Brundert M, Budzinski RM, Fruchart JC, Greten H, Castro GR 2003 Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates a higher selective cholesteryl ester uptake from LpA-I compared with LpA-I:A-II lipoprotein particles. Atherosclerosis 166:31–40.

115. Cai L, de Beer MC, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. J Biol Chem. 2005 Jan 28;280(4):2954-61.

116. Nieland TJ, Ehrlich M, Krieger M, Kirchhausen T. Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI. Biochim Biophys Acta. 2005 May 1;1734(1):44-51.

117. Parathath S, Darlington YF, de la Llera Moya M, Drazul-Schrader D, Williams DL, Phillips MC, Rothblat GH, Connelly MA. Effects of amino acid substitutions at

glycine 420 on SR-BI cholesterol transport function. J Lipid Res. 2007 Jun;48(6):1386-95.

118. Swarnakar S, Beers J, Strickland DK, Azhar S, Williams DL 2001 The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an α2-macroglobulin receptor. J Biol Chem 276:21121–21128.

119. Seo T, Al-Haideri M, Treskova E, Worgall TS, Kako J, Goldberg IJ, Deckelbaum RJ 2000 Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. J Biol Chem 275:30355–30362.

120. Nieland TJ, Shaw JT, Jaipuri FA, Duffner JL, Koehler AN, Banakos S, Zannis VI, Kirchhausen T, Krieger M. Identification of the molecular target of small molecule inhibitors of HDL receptor SR-BI activity. Biochemistry. 2008 Jan 8;47(1):460-72.

121. Nieland TJ, Penman M, Dori L, Krieger M, Kirchhausen T 2002 Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. Proc Natl Acad Sci USA 99:15422–15427.

122. Matveev S, van der Westhuyzen DR, Smart EJ 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 40:1647–1654.

123. Graf GA, Connell PM, van der Westhuyzen DR, Smart EJ 1999 The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae. J Biol Chem 274:12043–12048.

124. Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, Lublin DM, Franklin V, Williams DL, Lisanti MP 2002 Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. Biochemistry 41:11931–11940.

125. Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K 1995 VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 92:10339–10343.

126. Matveev S, Uittenbogaard A, van Der Westhuyzen D, Smart EJ 2001 Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. Eur J Biochem 268:5609–5616.

127. Graf GA, Matveev SV, Smart EJ 1999 Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis. Trends Cardiovasc Med 9:221–225.

128. Ikonen E, Parton RG 2000 Caveolins and cellular cholesterol balance. Traffic 1:212–217.

129. Uittenbogaard A, Everson WV, Matveev SV, Smart EJ 2002 Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. J Biol Chem 277:4925–4931.

130. Briand O, Lestavel S, Pilon A, Torpier G, Fruchart JC, Clavey V 2003 SR-BI does not require raft/caveola localisation for cholesteryl ester selective uptake in the human adrenal cell line NCI-H295R. Biochim Biophys Acta 1631:42–50.

131. Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, Williams DL 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 271:33545–33549.

132. Reaven E, Spicher M, Azhar S 1989 Microvillar channels: a unique plasma membrane compartment for concentrating lipoproteins on the surface of rat adrenal cortical cells. J Lipid Res 30:1551–1560.

133. Reaven E, Shi XY, Azhar S 1990 Interaction of lipoproteins with isolated ovary plasma membranes. J Biol Chem 265:19100–19111.

134. Plump AS, Erickson SK, Weng W, Partin JS, Brewslow JL, Williams DL 1996 Apolipoprotein A-I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production. J Clin Invest 97:2660–2671.

135. Williams DL, Wong JS, Hamilton RL 2002 SR-BI is required for microvillar channel formation and the localization of HDL particles to the surface of adrenocortical cells *in vivo*. J Lipid Res 43:544–549.

136. Silver DL, Wang N, Tall AR 2000 Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. J Clin Invest 105:151–159.

137. Liu B, Krieger M 2002 Highly purified scavenger receptor class B, type I reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes mediates high affinity HDL binding and selective lipid uptake. J Biol Chem 277:34125–34135.

138. Thuren T 2000 Hepatic lipase and HDL metabolism. Curr Opin Lipidol 11:277–283.

139. Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M 1998 The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 9:211–219.

140. Wang N, Weng W, Breslow JL, Tall AR 1996 Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knockout mice as a response to depletion of cholesterol stores. J Biol Chem 271:21001–21004.

141. Komaromy M, Azhar S, Cooper AD 1996 Chinese hamster ovary cells expressing a cell surface-anchored form of hepatic lipase. Characterization of low density lipoprotein and chylomicron remnant uptake and selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl ester. J Biol Chem 271:16906–16914.

142. Bergeron N, Kotite L, Verges M, Blanche P, Hamilton RL, Krauss RM, Bensadoun A, Havel RJ 1998 Lamellar lipoproteins uniquely contribute to hyperlipidemia in mice doubly deficient in apolipoprotein E and hepatic lipase. Proc Natl Acad Sci USA 95:15647–15652.

143. Lambert G, Chase MB, Dugi K, Bensadoun A, Brewer Jr HB, Santamarina-Fojo S 1999 Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. J Lipid Res 40:1294–1303.

144. Collet X, Tall AR, Serajuddin H, Guendouzi K, Royer L, Oliveira H, Barbaras R, Jiang XC, Francone OL 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 scavenger receptor B-I. J Lipid Res 40:1185–1193.

145. Verhoeven AJ, Carling D, Jansen H 1994 Hepatic lipase gene is transcribed in rat adrenals into a truncated mRNA. J Lipid Res 35:966–975.

146. Verhoeven AJ, Jansen H 1994 Hepatic lipase mRNA is expressed in rat and human steroidogenic organs. Biochim Biophys Acta 1211:121–124.

147. Vieira-van Bruggen D, Kalkman I, van Gent T, van Tol A, Jansen H 1998 Induction of adrenal scavenger receptor BI and increased high density lipoprotein-cholesteryl ether uptake by *in vivo* inhibition of hepatic lipase. J Biol Chem 273:32038–32041.

148. Foger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, Fruchart-Najib J, Paiz JA, Koch CA, Hoyt RF, Brewer Jr HB, 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.

149. de Beer FC, Connell PM, Yu J, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR 2000 HDL modification by secretory phospholipase A(2) promotes scavenger receptor class B type I interaction and accelerates HDL catabolism. J Lipid Res 41:1849–1857.

150. Yancey PG, de La Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, Johnson WJ, Williams DL, Rothblat GH 2000 HDL phospholipid composition is a

major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor-BI (SR-BI). J Biol Chem 275:36596–36604.

151. Temel RE, Parks JS, Williams DL 2002 Enhancement of SR-BI-mediated selective cholesteryl ester uptake from ApoA-I$^{-/-}$ HDL by ApoA-I requires HDL reorganization by LCAT. J Biol Chem 278:4792–4799.

152. Connelly MA, Kellner-Weibel G, Rothbla GH, Williams DL 2003 SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. J Lipid Res 44:331–341.

153. Duong M, Collins HL, Jin W, Zanotti I, Favari E, Rothblat GH. Relative contributions of ABCA1 and SR-BI to cholesterol efflux to serum from fibroblasts and macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Mar;26(3):541-7.

154. Chroni A, Nieland TJ, Kypreos KE, Krieger M, Zannis VI. SR-BI mediates cholesterol efflux via its interactions with lipid-bound ApoE. Structural mutations in SR-BI diminish cholesterol efflux. Biochemistry. 2005 Oct 4;44(39):13132-43.

155. Connelly MA, de la Llera-Moya M, Monzo P, Yancey PG, Drazul D, Stoudt G, Fournier N, Klein SM, Rothblat GH, Williams DL 2001 Analysis of chimeric receptors shows that multiple distinct functional activities of scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), are localized to the extracellular receptor domain. Biochemistry 40:5249–5259.

156. de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillips MC, Williams DL 1999 Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. J Lipid Res 40:575–580.

157. Kellner-Weibel G, de La Llera-Moya M, Connelly MA, Stoudt G, Christian AE, Haynes MP, Williams DL, Rothblat GH 2000 Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. Biochemistry 39:221–229.

158. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest JJ, Hayden MR 1999 Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet 22:336–345.

159. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G 1999 The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. Nat Genet 22:347–351.

160. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denefle P, Assmann G 1999 Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. Nat Genet 22:352–355.

161. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF 1999 The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. J Clin Invest 104:25–31.

162. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC 1999 Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res 40:781–796.

163. van der Westhuyzen DR, Cai L, de Beer MC, de Beer FC. Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I. J Biol Chem. 2005 Oct 28;280(43):35890-5.

164. Fielding PE, Nagao K, Hakamata H, Chimini G, Fielding CJ 2000 A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. Biochemistry 39:14113–14120.

165. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR 2000 Specific binding of apoA-I, enhanced cholesterol efflux and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. J Biol Chem 275:33053–33058.

166. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP 2000 ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. J Biol Chem 275:34508–34511.

167. Chambenoit O, Hamon Y, Marguet D, Rigneault H, Rosseneu M, Chimini G 2001 Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. J Biol Chem 276:9955–9960.

168. Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR 2001 ATP-binding cassette transporter a1 (abca1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. J Biol Chem 276:23742–23747.

169. Chen W, Silver DL, Smith JD, Tall AR 2000 Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages. J Biol Chem 275:30794–30800.

170. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. J Clin Invest. 2007 Aug;117(8):2216-24.

171. Sahoo D, Peng Y, Smith JR, Darlington YF, Connelly MA. Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) homo-dimerizes via its C-terminal region: fluorescence resonance energy transfer analysis. Biochim Biophys Acta. 2007 Jul;1771(7):818-29.

172. Sahoo D, Darlington YF, Pop D, Williams DL, Connelly MA. Scavenger receptor class B Type I (SR-BI) assembles into detergent-sensitive dimers and tetramers. Biochim Biophys Acta. 2007 Jul;1771(7):807-17.

173. Gossen, M. & Bujard, H. 1992 Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551.

174. Yao, F. , Svensjo, T. , Winkler, T. , Lu, M. , Eriksson, C. & Eriksson, E. 1998 Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. Hum. Gene Ther. 9, 1939-1950.

175. Balakrishnan L, Milavetz B. 2007 Histone hyperacetylation in the coding region of chromatin undergoing transcription in SV40 minichromosomes is a dynamic process regulated directly by the presence of RNA polymerase II. J Mol Biol. 5;365(1):18-30.

176. Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane- Robinson C, Allis CD, Workman JL. 1996 Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. EMBO J. 15(10):2508-18.

177. Krieger M, Kozarsky K. Influence of the HDL receptor SR-BI on atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 1999 Dec;10(6):491-7. Review.

178. Mineo C, Shaul PW. Circulating cardiovascular disease risk factors and signaling in endothelial cell caveolae. Cardiovasc Res. 2006 Apr 1;70(1):31-41. Epub 2006 Mar 15.Review.

179. 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 high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. Proc Natl Acad Sci U S A 96:9322–9327.

180. Braun A, Trigatti BL, Post MJ, Sato K, Simons M, Edelberg JM, Rosenberg RD, Schrenzel M, Krieger M (2002) Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. Circ Res 90:270–276.

181. Braun A, Zhang S, Miettinen HE, Ebrahim S, Holm TM, Vasile E, Post MJ, Yoerger DM, Picard MH, Krieger JL, Andrews NC, Simons M, Krieger M (2003) Probucol prevents early coronary heart disease and death in the high-density lipoprotein

receptor SR-BI/apolipoprotein E double knockout mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 100:7283–7288.

182. Karackattu SL, Picard MH, Krieger M (2005) Lymphocytes are not required for the rapid onset of coronary heart disease in scavenger receptor class B type I/apolipoprotein E double knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:803–808.

183. Karackattu SL, Trigatti B, Krieger M (2006) Hepatic lipase delays atherosclerosis, myocardial infarction and cardiac dysfunction and extends lifespan in SR-BI/apolipoprotein E double knockout mice. Arterioscler. Thromb Vasc Biol. 26(3): 548-54.

184. 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 high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. Proc Natl Acad Sci USA 96:9322–9327.

185. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ 2000 Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:721–727

186. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI 2001 Paraoxonase and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:473–480.

187. Pratico D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med.* 1998; 4: 1189–1192.

188. Terasawa Y, Ladha Z, Leonard SW, Morrow JD, Newland D, Sanan D, Packer L, Traber MG, Farese RV. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice deficient in alpha-tocopherol transfer protein and vitamin E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 13830–13834.

189. Thomas SR, Leichtweis SB, Pettersson K, Croft KD, Mori TA, Brown AJ, Stocker R. Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme q(10) inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 585–593.

190. Li XA, Titlow WB, Jackson BA, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M, Uittenbogaard A, Smart EJ. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem.* 2002; 277: 11058–11063.

191. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein

binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2001; 7: 853–857.

192. Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Guerin T, Li XA, Zhu W, Uittenbogaard A, Smart EJ. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1579–1587.

193. Zhu W, Saddar S, Seetharam D, Chambliss KL, Longoria C, Silver DL, Yuhanna IS, Shaul PW, Mineo C. The scavenger receptor class B type I adaptor protein PDZK1 maintains endothelial monolayer integrity. Circ Res. 2008 Feb 29; 102(4):480-7.

194. Assanasen C, Mineo C, Seetharam D, Yuhanna IS, Marcel YL, Connelly MA, Williams DL, de la Llera-Moya M, Shaul PW, Silver DL. Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling.J Clin Invest. 2005 Apr;115(4):969-77.

195. Van Eck M, Bos IS, Hildebrand RB, Van Rij BT, Van Berkel TJ. Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. Am J Pathol. 2004 Sep;165(3):785-94.

196. Holm TM, Braun A, Trigatti BL, Brugnara C, Sakamoto M, Krieger M, Andrews NC 2002 Failure of red blood cell maturation in mice with defects in the high-density lipoprotein receptor SR-BI. Blood 99:1817–1824.

197. 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 high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. Proc Natl Acad Sci USA 96:9322–9327.

198. Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11;94(23):12610-5.

199. Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, Williams DL 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 271:33545–33549.

200. Wang N, Weng W, Breslow JL, Tall AR 1996 Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knockout mice as a response to depletion of cholesterol stores. J Biol Chem 271:21001–21004.

201. Sun Y, Wang N, Tall AR 1999 Regulation of adrenal scavenger receptor-BI expression by ACTH and cellular cholesterol pools. J Lipid Res 40:1799–1805.

202. Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH 1997 Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. J Biol Chem 272:33068–33076.

203. Liu J, Voutilainen R, Heikkila P, Kahri AI 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 82:2522–2527.

204. Martin G, Pilon A, Albert C, Valle M, Hum DW, Fruchart JC, Najib J, Clavey V, Staels B 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 261:481–491.

205. Rodrigueza, W. V., Thuahnai, S. T., Temel, R. E., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Williams, D. L. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20344-20350.

206. Reeves PJ, Kim JM, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin: a tetracycline-inducible system in stable mammalian cell lines for high-level expression of opsin mutants. 1: Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 15; 99(21):13413-8.

207. Reeves PJ, Callewaert N, Contreras R, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I- negative HEK293S stable mammalian cell line. 1: Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 15;99(21):13419-24.

208. Ray, K., Fan, G. F., Goldsmith, P. K., and Spiegel, A. M. 1997 The carboxyl terminus of the human calcium receptor. Requirements for cell-surface expression and signal transduction. J. Biol. Chem. 272, 31355-31361.

209. Bai, M., Quinn, S., Trivedi, S., Kifor, O., Pearce, S. H., Pollak, M. R., Krapcho, K., Hebert, S. C., and Brown, E. M. 1996 Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca2+o-sensing receptor. J. Biol. Chem. 271, 19537-19545.

210. Zannis, V.I., E.E. Zanni, A. Papapanagiotou, D. Kardassis, A. Chroni. 2006. ApoA-I functions and synthesis of HDL: Insights from mouse models of human HDL metabolism. In: High-Density Lipoproteins. From Basic Biology to Clinical Aspects (C.J. Fielding, ed.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 237-265.

211. Vishnyakova TG, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Eggerman TL, Patterson AP. Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-

1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. J Biol Chem. 2003 Jun 20;278(25):22771-80. Epub 2003 Mar 21.

212. Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW (2003) High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. J Biol Chem 278:9142–9149.

213. Shaul PW (2003) Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. J Physiol 547:21–33.

214. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW (2001) High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. Nat Med 7:853–857.

215. Li XA, Titlow WB, Jackson BA, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M, Uittenbogaard A, Smart EJ (2002) High density lipoprotein binding to scavenger receptor, class B, typeI activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide dependent manner. J Biol Chem 277:11058–11063.

216. Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Guerin T, Li XA, Zhu W, Uittenbogaard A, Smart EJ (2003) HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner. J Clin Invest 111:1579–1587.

217. Li XA, Guo L, Dressman JL, Asmis R, Smart EJ (2005) A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by SR-BI and suppressed by eNOS and HDL. J Biol Chem 280:19087–19096.

218. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M 1996 Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271:518–520.

219. Landschulz K, Pathak R, Rigotti A, Krieger M, Hobbs 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 98:984–995.

220. Zhang S, Picard MH, Vasile E, Zhu Y, Raffai RL, Weisgraber KH, Krieger M. Diet-induced occlusive coronary atherosclerosis, myocardial infarction, cardiac dysfunction, and premature death in scavenger receptor class B type I-deficient, hypomorphic apolipoprotein ER61 mice. *Circulation.* 2005; 111: 3457–3464.

221. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. Circ Res. 2006 Jun 9;98(11):1352-64. Review.

222. Goti D, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Frank S, van Der Westhuyzen DR, Malle E, Sattler W 2001 Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. J Neurochem 76:498–508.

223. Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, Quinones V, Amigo L, Rozowski T. Krieger M, Rigotti A 2002 α-Tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. J Nutr 132:443–449.

224. Burck, U.; Goebel, H. H.; Kuhlendahl, H. D.; Meier, C.; Goebel, K. M. : Neuromyopathy and vitamin E deficiency in man. *Neuropediatrics* 12: 267-278, 1981.

225. Binder, H. J.; Solitare, G. B.; Spiro, H. M. Neuromuscular disease in patients with steatorrhoea. *Gut* 8: 605-611, 1967.

226. Tanyel MC, Mancano LD. Neurologic findings in vitamin E deficiency. Am Fam Physician. 1997 Jan;55(1):197-201. Review.

227. Arvy L. [Kidney and vitamin E] Laval Med. 1968 Nov;39(9):853-69.

228. Suda T, Akamatsu A, Nakaya Y, Masuda Y, Desaki J. Alterations in erythrocyte membrane lipid and its fragility in a patient with familial lecithin:cholesterol acyltrasferase (LCAT) deficiency. J Med Invest. 2002 Aug;49(3-4):147-55.

229. Singer, K.; Fisher, B.; Perlstein, M. A. Acanthrocytosis (sic): a genetic erythrocytic malformation. *Blood* 7: 577-591, 1952.

230. Druez, G. Un nouveau cas d'acanthocytose: dysmorphie erythrocytaire congenitale avec retinite, troubles nerveux et stigmates degeneratifs. *Rev. Hemat.* 14: 3-11, 1959.

231. Kimber RJ, Allen SH. An abnormality of the bone marrow associated with vitamin E deficiency in sheep. Br J Nutr. 1975 May;33(3):357-71.

232. Saito K, Matsumoto S, Yokoyama T, Okaniwa M, Kamoshita S. Pathology of chronic vitamin E deficiency in fatal familial intrahepatic cholestasis (Byler disease). Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1982 Aug;396(3):319-30.

233. Sobrevilla, L. A.; Goodman, M. L.; Kane, C. A. Demyelinating central nervous system disease, macular atrophy and acanthocytosis (Bassen-Kornzweig syndrome). *Am. J. Med.* 37: 821-832, 1964.

234. Muller, D. P. R.; Lloyd, J. K.; Bird, A. C. Long-term management of abetalipoproteinaemia: possible role for vitamin E. *Arch. Dis. Child.* 52: 209-214, 1977.

235. Muller, D. P. R.; Lloyd, J. K.; Wolff, O. H. The role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption. *J. Inherit. Metab. Dis.* 8 (suppl. 1): 88-92, 1985.

236. Mier, M.; Schwartz, S. O.; Boshes, B. Acanthocytosis, pigmentary degeneration of the retina and ataxic neuropathy: a genetically determined syndrome with associated metabolic disorder. *Blood* 16: 1586-1608, 1960.

237. Provost AC, Pequignot MO, Sainton KM, Gadin S, Salle S, Marchant D, Hales DB, Abitbol M. Expression of SR-BI receptor and StAR protein in rat ocular tissues. C R Biol. 2003 Sep;326(9):841-51.

238. Duncan KG, Bailey KR, Kane JP, Schwartz DM. Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Apr 12;292(4):1017-22.

239. Kiefer C, Sumser E, Wernet MF, Von Lintig J 2002 A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 99:10581–10586.

240. Voolstra O, Kiefer C, Hoehne M, Welsch R, Vogt K, von Lintig J. The Drosophila class B scavenger receptor NinaD-I is a cell surface receptor mediating carotenoid transport for visual chromophore synthesis.Biochemistry. 2006 Nov 14;45(45):13429-37.

Παράρτημα Α

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ APOE3 ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΥ

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απολιποπρωτεΐνη Ε είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στην πρόσληψη από τα κύτταρα και τον καταβολισμό λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoE. Η apoE ενσωματωμένη σε λιποσώματα ή λιποπρωτεΐνες, είναι συνδέτης του υποδοχέα της LDL καθώς και άλλων υποδοχέων, όπως ο apoER2, ο υποδοχέας της VLDL (VLDL receptor, VLDLr) και ο LRP (Low density lipoprotein receptor-Related Protein) (1). Μία από τις κύριες λειτουργίες της apoE in vivo, είναι η απομάκρυνση των υπολειμάτων των χυλομικρών που δημιουργούνται μετά από υδρόλυση των χυλομικρών από την λιποπρωτεϊνική λιπάση. Μελέτες in vitro και in vivo έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις της apoE που εμποδίζουν την πρόσδεση λιποπρωτεϊνών που περιλαμβάνουν apoE, στον υποδοχέα της LDL, σχετίζονται με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα και προκαλούν πρόωρη αθηροσκλήρωση στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα (2,3,4). Η apoE συμμετέχει επιπλέον στις διαδικασίες κυτταρικής εξόδου χοληστερόλης (5,6,7,8) και έτσι συμβάλλει στην ομοιόσταση της χοληστερόλης σε κυτταρικό και ιστικό επίπεδο, καθώς και στην προστασία από την αθηροσκλήρωση (9,10). Εκτός από το ρόλο του στην παθογένεση και στην προστασία από καρδιαγγειακές νόσους, η apoE ενέχεται επίσης στη νόσο του Alzheimer (11,12,13).

Στον ανθρώπινο πληθυσμό έχουν βρεθεί τρεις κοινές ισομορφές της ApoE: η ApoE2, η ApoE3 και η ApoE4, που προκύπτουν από τρεις μεταλλάξεις στο γονίδιο της apoE, που δημιουργούν τα αλλήλια ε2, ε3 και ε4 (14). Το πιο κοινό αλληλόμορφο είναι το ε3, που απαντάται στο 85 % του καυκάσιου πληθυσμού (15). Σκοπός του τμήματος αυτού της διατριβής ήταν η παραγωγή αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της ApoE3 με το

σύστημα έκφρασης του βακουλοϊού, που αποτελεί ένα εύχρηστο ευκαριωτικό σύστημα έκφρασης ετερόλογων γονιδίων που οδηγεί σε υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης (μέχρι 100 mg πρωτεΐνης ανά 10^9 κύτταρα). Το σύστημα του βακουλοϊού επίσης εξασφαλίζει τη σωστή αναδίπλωση των ετερόλογων πρωτεϊνών που εκφράζονται, καθώς και το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, τον ολιγομερισμό και άλλες σημαντικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Συνεπώς, η εκφραζόμενη πρωτεΐνη αναμένεται να έχει τη σωστή βιολογική δραστικότητα.

Το σύστημα αυτό βασίζεται στη μεταφορά του μελετώμενου γονιδίου (της ApoE3 στην προκειμένη περίπτωση) από έναν πλασμιδιακό φορέα (pFASTBac), στο γονιδίωμα του βακουλοϊού, με ομόλογο ανασυνδυασμό. Το υβριδικό αυτό γονιδίωμα χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση κυττάρων εντόμων (Sf9, *Spodoptera frugiperda*), τα οποία αποτελούν φυσικούς ξενιστές του βακουλοϊού και τα οποία εν συνεχεία εκφράζουν την πρωτεΐνη-στόχο.

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ / ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Κατασκευή Πλασμιδίων Έκφρασης της Αγρίου Τύπου ApoE3 - Έκφραση της Αγρίου Τύπου ApoE3 στο Σύστημα του Βακουλοϊού και Καθαρισμός της Πρωτεΐνης με Στήλη NiNTA

Αρχικά, η ApoE3 ελήφθη ως προϊόν PCR από το πλαμίδιο pUC19-ApoE3, όπου ήταν κλωνοποιημένη, με τη χρήση εκκινητών που περιλαμβάνουν περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα BamHI και SalI (Εικ.1). Το τμήμα του cDNA που ελήφθη, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 11 και 910 δεν περιέχει το πεπτίδιο σήμα, ώστε η εκφραζόμενη πρωτεΐνη να μην εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο, αλλά να παραμένει εντός των κυττάρων (Εικ.1).

```
                                                                  BamHI
                                                                acgcg↓gatccaaggtg
 17 gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc
 77 ggccagcgct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca
137 ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agctcccagg tcacccagga actgagggcg
197 ctgatggacg agaccatgaa ggagttgaag gcctacaaat cggaactgga ggaacaactg
257 accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgcaggcc
317 cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg
377 caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctcgcctc ccacctgcgc
437 aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagcgcct ggcagtgtac
497 caggccgggg cccgcgaggg cgccgagcgc ggcctcagcg ccatccgcga gcgcctgggg
557 cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg
617 ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcggatgga ggagatgggc
677 agccggaccc gcgaccgcct ggacgaggtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag
737 ctggaggagc aggcccagca gatacgcctg caggccgagg ccttccaggc ccgcctcaag
797 agctggttcg agcccctggt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag
857 gtgcaggctg ccgtgggcac cagcgccgcc cctgtgccca gcgacaatca ctg/acagct↑g
                                                                  SalI
```

Εικ. 1. Αλληλουχία cDNA της apoE3 και Σχεδιασμός Εκκινητών για την Απομόνωσή της από το Πλασμίδιο pUC19-ApoE3

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR, αρχικά αναμίχθησαν τα παρακάτω συστατικά:

- 10 – 50 ngr κατάλληλης μήτρας DNA
- 1x BSA (Bovine Serum Albumin αρχικής συγκέντρωσης 1mg/ml)
- 1 mM dNTPs (10x : 10mM συνολική αρχική συγκέντρωση)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Thermo Pol (1x: 10mM KCl, 20mM Tris – Cl pH 8.8, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 2mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100)
- 0.3 – 0.5 units DNA πολυμεράσης Vent (NEB 2.000units/ml)
- 100 ngr από κάθε εκκινητή
- αποστειρωμένο H_2O μέχρι τελικό όγκο 20 μl.

Το ανωτέρω διάλυμα εθερμάνθη για 5 λεπτά στους 94^0 C (αποδιάταξη) και στη συνέχεια υπεβλήθη σε 30 – 35 κύκλους πολλαπλασιασμού, οι οποίοι περιλαμβάνουν διαδοχικά στάδια αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας και επιμήκυνσης των νέων αλυσίδων στους 72^0 C. Στο τρίτο στάδιο γίνεται η τελική επέκταση των ήδη υπαρχουσών αλυσίδων στους 72^0 C για 2 – 5 λεπτά. Η

θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας υπολογίζεται από τον παρακάτω γενικό τύπο: Tm = (G + C) X 4+ (A + T) X 2.

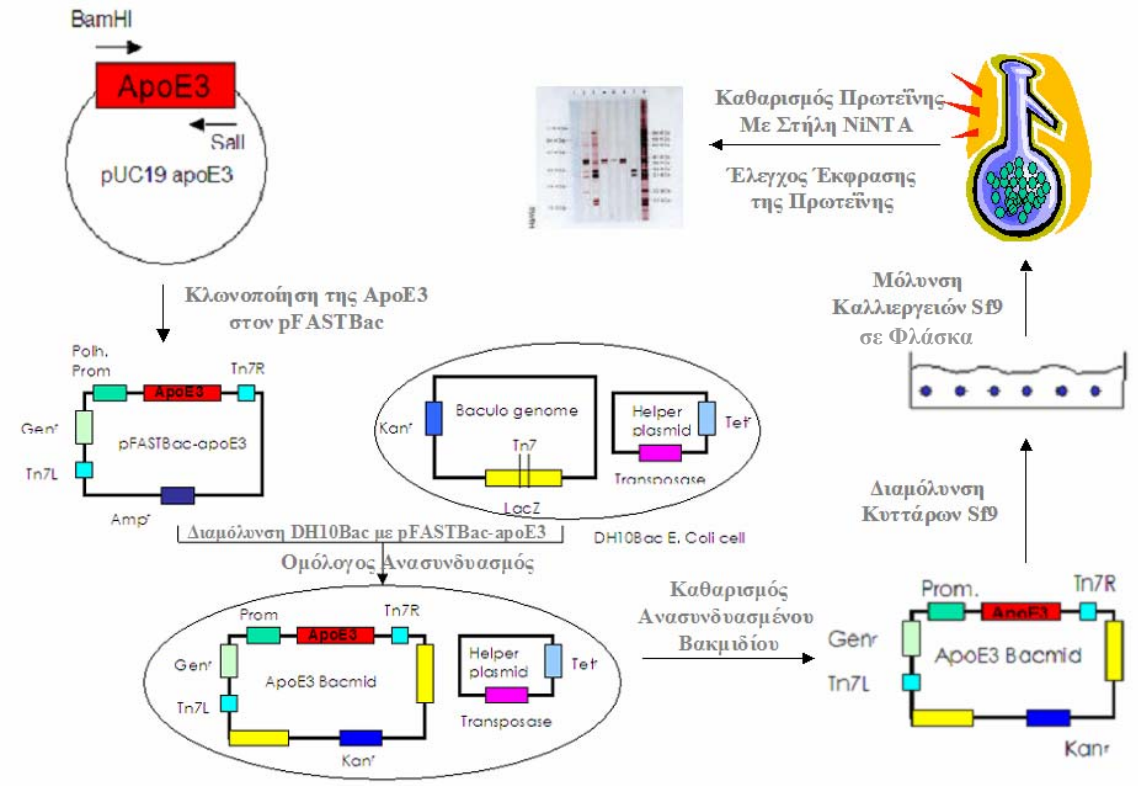
Το προϊόν της αντίδρασης PCR κλωνοποιήθηκε στις περιοριστικές θέσεις BamHI και SalI του πολυσυνδέτη του πλασμιδιακού φορέα pFASTBac που περιέχει γονίδια αντίστασης στην αμπικιλλίνη και τη γενταμυκίνη (Invitrogen) (Εικ.2). Αυτό το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει επίσης έναν επίτοπο ιστιδίνης και την περιοχή τμήσης από πρωτεάσες του Tobacco Etched Virus (TEV). Ο συνδυασμός του επιτόπου ιστιδίνης και της περιοχής τμήσης έχει την εξής ακολουθία: MSYYHHHHHHDYDIPTTFNLYFQGAMGS. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων DH10Bac (E.Coli), τα οποία περιλαμβάνουν το γένωμα του βακουλοϊού που περιέχει το γονίδιο της lacZ και το γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη. Τα κύτταρα αυτά φέρουν επίσης ένα βοηθητικό πλασμίδιο το οποίο κωδικοποιεί μία τρανσποζάση. Το ένζυμο αυτό μεταθέτει την ApoE3 από το pFASTBac στο γονίδιο του LacZ, που προσετέθη στο γονιδίωμα του βακουλοϊού, δημιουργώντας ένα ανασυνδυασμένο γονιδίωμα το οποίο καλείται βακμίδιο. Η μεταφορά του γονιδίου της apoE μέσω της τρανσποζάσης, εντός του γονιδίου της LacZ, εμποδίζει την έκφραση της LacZ. Επομένως, οι κυτταρικές αποικίες οι οποίες περιέχουν το βακμίδιο αναγνωρίστηκαν από την αντίσταση που εμφανίζουν στην καναμυκίνη, τη γενταμυκίνη και την τετρακυκλίνη και από την αδυναμία καταβολισμού της γαλακτοζιδάσης (και δίνουν λευκές αποικίες δεδομένου ότι το γονίδιο lacZ στο γένωμα του βακουλοϊού έχει απενεργοποιηθεί κατά τη διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού). Τρεις από αυτές τις αποικίες επελέγησαν για μικρής κλίμακας καλλιέργεια. Ακολούθησε καθαρισμός του ανασυνδυασμένου βακμιδιακού DNA σε καλλιέργεια μικρής κλίμακας (mini-preps), και χρησιμοποίησή του για τη διαμόλυνση κυττάρων εντόμου Sf9 με χρήση του αντιδραστηρίου Cellfectin^{R}.

Το αντιδραστήριο Cellfectin είναι μια παρασκευή λιποσωμάτων του κατιονικού λιπιδίου N,N^{I},N^{II},N^{III}-Τετραμεθυλ-N,N^{I},N^{II},N^{III}-τετραπαλμιτυλ-σπερμίνη (TM-TPS) και της διολεοϋλ-φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (DOPE), σε μοριακή αναλογία 1:1.5 σε αποστειρωμένο νερό. Προκειμένου να διαμολυνθούν κύτταρα Sf9 σε τρυβλία 6 θέσεων

χρησιμοποιείται το παρακάτω πρωτόκολλο (όλοι οι όγκοι και οι ποσότητες αναφέρονται σε ένα δείγμα):

Επιστρώνονται $9X10^5$ κυττάρων Sf9 σε 2ml θρεπτικού μέσου Sf-900 II SFM που περιλαμβάνει 50 μονάδες/ml πενικιλλίνη και 50 μg/ml στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αφήνονται να προσδεθούν στα πηγάδια για περίπου 1 ώρα. Για κάθε δείγμα διαμόλυνσης, προετοιμάζονται συμπλέγματα DNA/Cellfectin ως εξής:

- Αραιώνονται 1-2μg DNA βακουλοϊού σε 100μl Sf-900 II SFM χωρίς αντιβιοτικά.
- Το αντιδραστήριο Cellfectin αναδεύεται πριν από τη χρήση και αραιώνεται με προσθήκη 1.5-9 μl Cellfectin σε 100μl Sf-900 II SFM χωρίς αντιβιοτικά.
- Αναμειγνύεται το αραιό DNA με το αραιωμένο Cellfectin (συνολικός όγκος: 200μl).
- Το συνολικό μείγμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται για 15-45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα τα οποία εν συνεχεία πλένονται μια φορά με Sf-900 II SFM χωρίς αντιβιοτικά.
- Αφαιρείται το υλικό πλύσης.
- Προστίθενται 0.8 ml Sf-900 II SFM στα συμπλέγματα DNA/Cellfectin, ακολουθεί ήπια ανάδευση και προσθήκη τους στα κύτταρα.
- Τα κύτταρα επωάζονται στους 28^oC για 5 ώρες.
- Αφαιρείται το μίγμα διαμόλυνσης και αντικαθίσταται με 2ml θρεπτικού μέσου Sf-900 II SFM που περιλαμβάνει αντιβιοτικά.
- Τα κύτταρα επωάζονται στους 28^oC για 48 ώρες.
- Μετά 48 ώρες ακολουθεί δοκιμασία (στην εργασία αυτή ανάλυση Western) για τον έλεγχο της έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου.



Εικ. 2. Σχέδιο Έκφρασης της Αγρίου Τύπου ApoE3 με το Σύστημα του Βακουλοϊού

Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στους 28°C, μέχρις ότου παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά σημεία διαμόλυνσης (παύση κυτταρικής ανάπτυξης, αύξηση κυτταρικής διαμέτρου, εκσήμανση κυτταρικού πυρήνα), μετά από 96 ώρες περίπου. Στο σημείο αυτό, τα κύτταρα συνελέγησαν και το θρεπτικό μέσο (το οποίο περιέχει πλέον ανασυστημένους βακουλοϊούς που φέρουν το ανασυνδυασμένο γένωμα) χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση 250 ml καλλιέργειας κυττάρων Sf9 σε φάση λογαριθμικής ανάπτυξης. Οι καλλιέργειες αυτές διατηρήθηκαν μέχρις ότου παρατηρήθηκαν σημεία κυτταρικής μόλυνσης. Στη συνέχεια τα κύτταρα συνελέγησαν και χρησιμοποιήθηκαν γα την απομόνωση της apoE3.

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας συγγενείας σε ακινητοποιημένα ιόντα μετάλλων (immobilized metal ion affinity

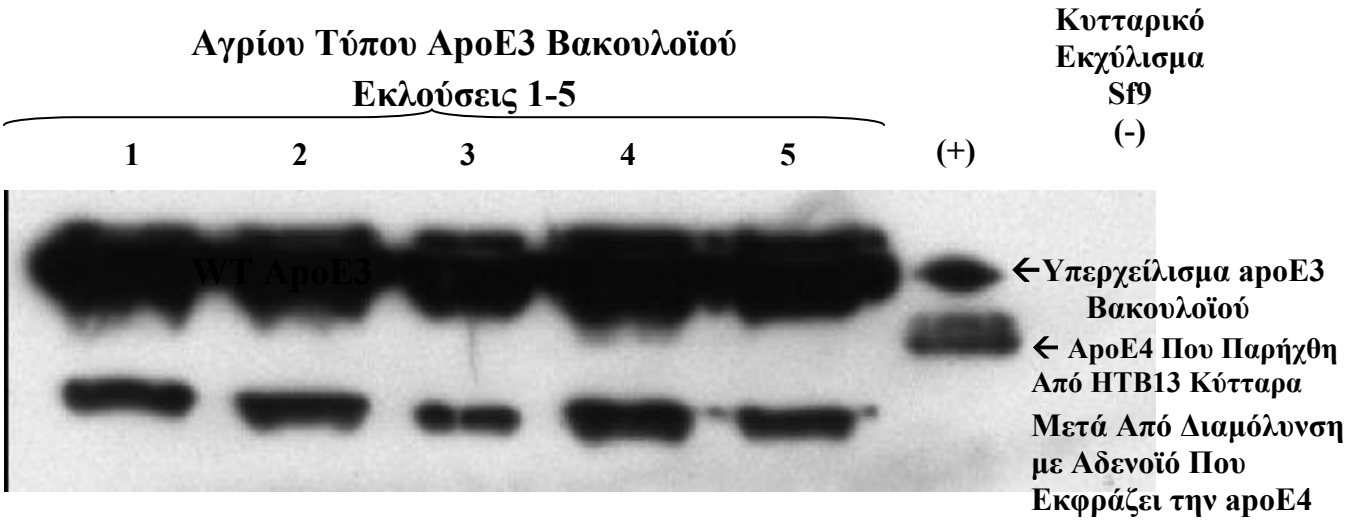
chromatography). Η τεχνική αυτή επιτρέπει σε πρωτεΐνες που έχουν χημική συγγένεια με ιόντα μετάλλων να κατακρατώνται σε στήλη που περιέχει ακινητοποιημένα τέτοια ιόντα, όπως του χαλκού, του ψευδαργύρου, του σιδήρου και στην προκειμένη περίπτωση, του νικελίου. Πολλές πρωτεΐνες, στη φυσική τους κατάσταση, δεν εμφανίζουν τέτοια συγγένεια και επομένως απαιτούνται τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA για να εισαγάγουν την ιδιότητα αυτή στην πρωτεΐνη-στόχο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση προσετέθη στην apoE3 ο επίτοπος ιστιδίνης (His-tag), ο οποίος ήταν ενσωματωμένος στο πλασμίδιο pFASTBac μετά τον υποκινητή (polyhedrin promoter), σε φάση με το γονίδιο της apoE.

Ο επίτοπος His tag προσδένεται στα ιόντα νικελίου, τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά με την ένωση NTA [Nitriloacetic acid (NTA), $C_6H_9NO_6$), στα σφαιρίδια της ρεζίνης που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό (βλέπε πιο κάτω). Προκειμένου να εκλουσθεί η προσδεδεμένη στη στήλη πρωτεΐνη, χρησιμοποιήθηκε η προσθήκη ιμιδαζόλης. Το ιμιδαζόλιο προσδένεται στα ιόντα νικελίου και επομένως εκτοπίζει την προσδεδεμένη πρωτεΐνη. Έκλουση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με αύξηση του pH.

Για την απομόνωση της apoE3 από εκύλισμα κυττάρων Sf9, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, με χρήση ρεζίνης NiNTA και διαλυμάτων από εμπορική συσκευασία της εταιρίας QIAGEN (#30600). Οι όγκοι και ποσότητες που αναφέρονται αντιστοιχούν σε κυτταρική πελέτα από καλλιέργεια 250ml Sf9 κυττάρων.

Η κυτταρική πελέτα αποψύχεται για 15 λεπτά στον πάγο και τα κύτταρα επαναιωρούνται με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (Lysis Buffer, 6 M υδροχλωρική γουανιδίνη, 20 mM φωσφορικό νάτριο, pH 7.8, 500 mM χλωριούχο νάτριο). Τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά και αναμιγνύονται 2-3 φορές με ήπια ανακίνηση. Το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στα 14,000 x *g* για 30 min στους 4°C και φυλάσσεται το υπερκείμενο. Η ρεσίνη NiNTA επαναιωρείται ήπια και προστίθεται στο κυτταρικό εκχύλισμα. Ο απαιτούμενος όγκος της ρεσίνης υπολογίζεται από την ικανότητα πρόσδεσής της και την αναμενόμενη απόδοση της κυτταρικής σειράς Sf9 σε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, όπως έχει εκτιμηθεί από προηγούμενους καθαρισμούς. Το

μείγμα αναδεύεται ήπια με αναστροφή στους 4°C επί 1 ώρα. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια αφήνονται να καθιζάνουν και αφαιρείται το υπερκείμενο. Τα σφαιρίδια πλένονται 2 φορές με 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (Wash Buffer, 50 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 20 mM ιμιδαζόλη), με ήπια ανάδευση του μίγματος με αναστροφή στους 4°C επί 1 ώρα. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια αφήνονται να καθιζάνουν και αφαιρείται το υπερκείμενο. Για την έκλουση της πρωτεΐνης, προστίθεται 1 ml διαλύματος έκλουσης (Native Elution Buffer, 50 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 250 mM ιμιδαζόλη) και πραγματοποιείται επώαση με ανάδευση του μείγματος με αναστροφή στους 4°C επί 1 ώρα. Τα σφαιρίδια αφήνονται να καθιζάνουν και συλλέγεται το υπερκείμενο, που εμπεριέχει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Πραγματοποιούνται συνολικά 5 τέτοιες εκλούσεις. Η ταυτότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης επιβεβαιώνεται στη συνέχεια με ανάλυση Western (Εικ. 3).

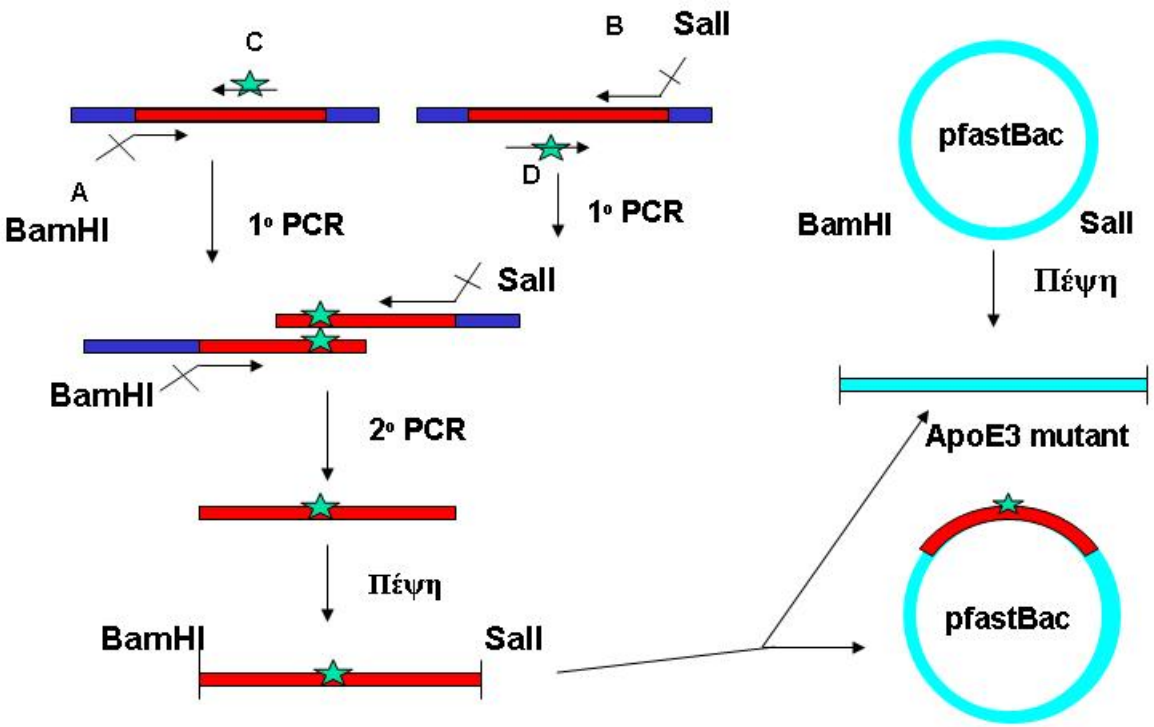


Εικ. 3 Ανάλυση Western για τον Έλεγχο της Παραγωγής της Αγρίου Τύπου ApoE3 από πέντε καλλιέργειες Sf9 κυττάρων (στήλες 1-5) που διεμολύνθησαν με βακουλοϊό που εκφράζει την apoE3. Η apoE που παρήχθη με το σύστημα του βακουλοϊού περιέχει 6 aminids που φέρουν τον επίτοπο Histag και το Tobacco Etched Virus Protease Cleavage Site.

2. Μεταλλαξιγένεση της ApoE3 με PCR Επέκταση Αλληλοεπικαλυπτόμενων Αλληλουχιών (Overlap Extension PCR)

Αφού διαπιστώθηκε η δυνατότητα έκφρασης της αγρίου τύπου apoE3 με το σύστημα του βακουλοϊού, έγιναν μεταλλάξεις στην apoE3 με χρήση της τεχνικής PCR επέκτασης αλληλοεπικαλυπτόμενων αλληλουχιών (Εικ. 4). Η παραλλαγή αυτή της κλασικής αντίδρασης PCR που περιεγράφη στα «Υλικά και Μέθοδοι», περιλαμβάνει το σχεδιασμό δύο μεταλλαξιγόνων εκκινητών, που περιέχουν μια επιθυμητή μεταλλαγή και είναι μερικώς ή εξ'ολοκλήρου συμπληρωματικοί ο ένας ως προς τον άλλο. Κάθε ένας από τους δύο αυτούς εκκινητές χρησιμοποιείται σε μια ξεχωριστή αντίδραση PCR (χωριστοί σωλήνες, ίδιες συνθήκες) μαζί με έναν εξωτερικό εκκινητή για το κάθε ένα από τα δύο άκρα της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει θα πολλαπλασιαστεί .

Το προϊόν των δύο αυτών αντιδράσεων PCR που παράγονται, αναμειγνύονται και χρησιμοποιούνται σαν μήτρες σε αντίδραση PCR που πραγματοποιείται με μόνο τους εξωτερικούς εκκινητές. Αρχικά οι ακολουθίες DNA συνδυάζονται στην περιοχή που παρουσιάζει συμπληρωματικότητα και δρουν το ένα ως εκκινητής του άλλου, για να δώσουν το πλήρες προϊόν (Εικ. 4). Το δίκλωνο DNA που παράγεται εν συνεχεία πολλαπλασιάζεται με χρήση των εξωτερικών εκκινητών. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο σχεδιασμό των εκκινητών, ώστε οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους να είναι στην ίδια περιοχή.



Εικ. 4 Παραγωγή Μεταλλαγμένων Μορφών της ApoE3 με PCR Επέκταση Αλληλοεπικαλυπτόμενων Αλληλουχιών και Κλωνοποίησή τους στον Πλασμιδιακό Φορέα Έκφρασης pfastBac

Οι εξωτερικοί (A,B) και μεταλλαξιγόνοι εκκινητές (C,D) που χρησιμοποιήθηκαν, οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες και οι επιθυμητές μεταλλάξεις δείχνονται παρακάτω:

Εξωτερικοί Εκκινητές (A,B)

A: ApoE3WT-5

BamHI
↓
5'- ACGC GGA TCC AAG GTG GAG CAA GCG GTG GAG ACA GAG C

Μήκος: 38, Tm: 87.7 ^{O}C

B: ApoE3WT-3

SalI
↓
5'- ACGC GTC GAC TCA GTG ATT GTC GCT GGG CAC AGG GGC G

Μήκος: 38, Tm: 89.16 ^{O}C

Μεταλλαξιγόνοι εκκινητές (C,D) & μεταλλάξεις (1,2,3,4)

1) Leu148 (CTC), 149 (CTC)→ Ala (Υδρόφοβες Αλληλεπιδράσεις Ελίκων)

Alanine	Ala	A	GCA GCC GCG GCU

Μεταλλαξιγόνοι εκκινητές

5' GCAAGCTGCGTAAGCGGGCCGCCCGCGATGCCGATGACCT 3' (C)

Rev. Com. AGGTCATCGGCATCGCGGGCGGCCCGCTTACGCAGCTTGC (D)

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Μήκος: 40, Tm: 77, %GC: 70

2) Arg142 (CGC)→ Val Arg145 (CGT)→Val (Πρόσδεση στον Υποδοχέα)

Valine	Val	V	GUA GUC GUG GUU

Μεταλλαξιγόνοι εκκινητές

5’ CTCGCCTCCCACCTGGTCAAGCTGGTTAAGCGGCTCCTCC 3’

Rev. Com. GGAGGAGCCGCTTAACCAGCTTGACCAGGTGGGAGGCGAG

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Μήκος: 40, Tm: 75, %GC: 65

3) Thr194 (ACT)→Ala (O-Γλυκοζυλίωση)

Alanine	Ala	A	GCA GCC GCG GCU

Μεταλλαξιγόνοι εκκινητές

5’ CGTGCGGGCCGCCGCTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCA 3’

Rev. Com. TGGCCGGCCAGGGAGCCCACAGCGGCGGCCCGCACG

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Μήκος: 36, Tm: 80, %GC: 83

4) Arg25 (CGC)→Ala, Arg32 (CGC)→Ala (Αλληλεπιδράσεις Φορτίου Ελίκων)

Alanine	Ala	A	GCA GCC GCG GCU

Μεταλλαξιγόνοι εκκινητές

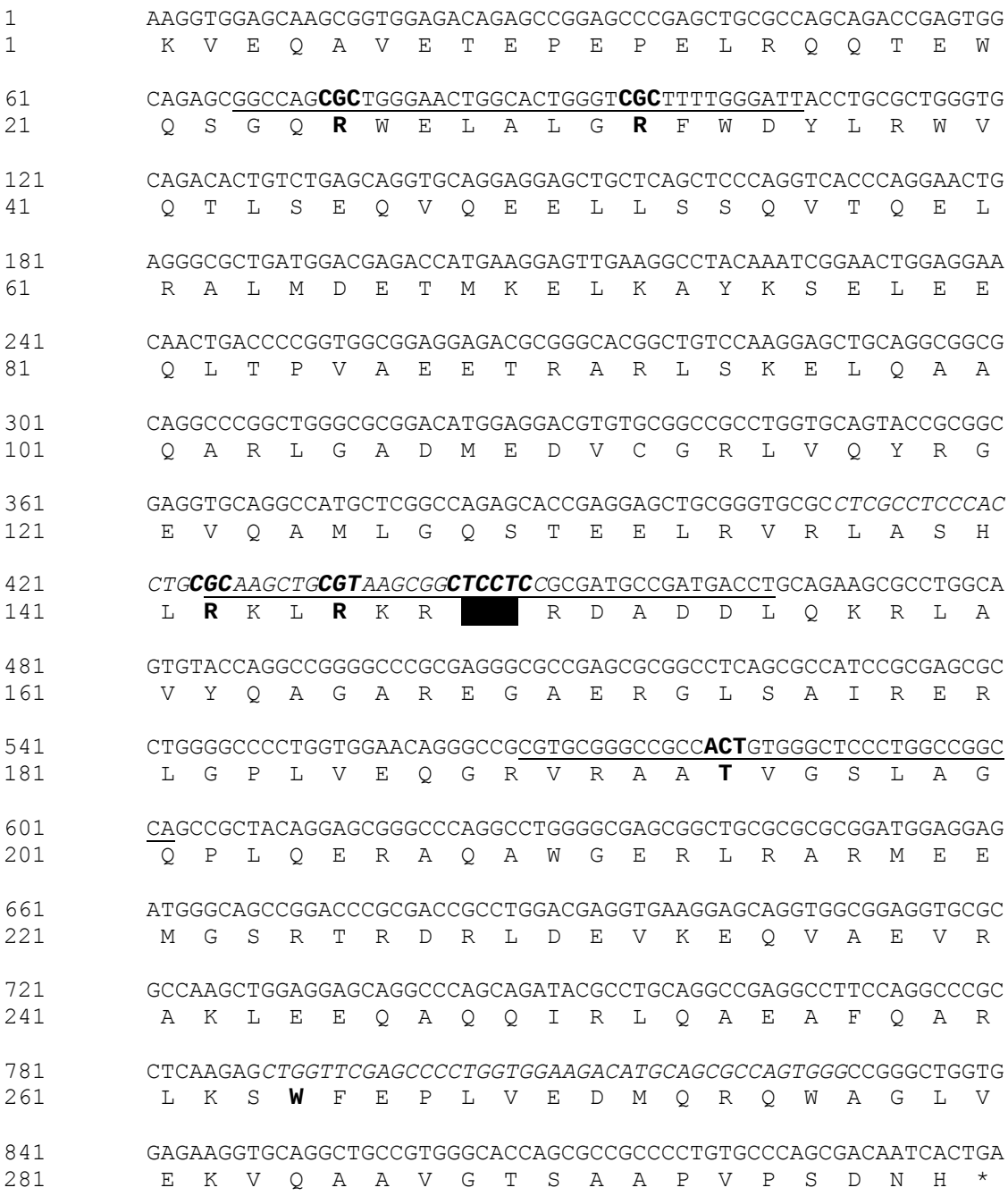
5’ GGCCAGGCCTGGGAACTGGCACTGGGTGCCTTTTGGGATT 3’

Rev. Com. AATCCCAAAAGGCACCCAGTGCCAGTTCCCAGGCCTGGCC

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Μήκος: 40, Tm: 74, %GC: 63

Η εντόπιση των μεταλλάξεων και των μεταλλαξιγόνων εκκινητών στην αλληλουχία cDNA της ApoE3 δείχνεται στην Εικ. 5. Σκοπός των πειραμάτων ήταν οι μεταλλαγμένες μορφές της apoE3 που παρήχθησαν με την παραπάνω τεχνική PCR, να κλωνοποιηθούν στη συνέχεια στον πλασμιδιακό φορέα pFASTBac με χρήση του συστήματος του βακουλοϊού, όπως περιεγράφη πιο πάνω, για να παραχθή πρωτεΐνη και να χρησιμοποιηθεί για πειράματα πρόσδεσης στον SR-BI, πρωτεολιποσωμάτων που περιέχουν αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές της apoE.



Εικ. 5. Αλληλουχία cDNA και Αμινοξική Αλληλουχία της ApoE3. Τα Προς Μετάλλαξη κωδικόνια είναι Τονισμένα, ενώ τα Αντίστοιχα Αμινοξέα Δείχνονται Έγχρωμα. Οι Μεταλλαξιγόνοι Εκκινητές είναι Υπογραμμισμένοι.

Βιβλιογραφία

1. Rebeck GW, LaDu MJ, Estus S, Bu G, Weeber EJ. The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. Mol Neurodegener. 2006 Oct 24;1:15.

2. Cullen P, Cignarella A, Brennhausen B, Mohr S, Assmann G, von Eckardstein A. Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. J Clin Invest. 1998 Apr 15;101(8):1670-7.

3. Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. Science. 1995 Feb 17;267(5200):1034-7.

4. Fazio S, Babaev VR, Murray AB, Hasty AH, Carter KJ, Gleaves LA, Atkinson JB, Linton MF.Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 29;94(9):4647-52.

5. Shimano H, Ohsuga J, Shimada M, Namba Y, Gotoda T, Harada K, Katsuki M, Yazaki Y, Yamada N. Inhibition of diet-induced atheroma formation in transgenic mice expressing apolipoprotein E in the arterial wall. J Clin Invest. 1995 Feb;95(2):469-76.

6. Dong LM, Parkin S, Trakhanov SD, Rupp B, Simmons T, Arnold KS, Newhouse YM, Innerarity TL, Weisgraber KH. Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. Nat Struct Biol. 1996 Aug;3(8):718-22.

7. Wardell MR, Brennan SO, Janus ED, Fraser R, Carrell RW. Apolipoprotein E2-Christchurch (136 Arg----Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia. J Clin Invest. 1987 Aug;80(2):483-90.

8. Rall SC Jr, Newhouse YM, Clarke HR, Weisgraber KH, McCarthy BJ, Mahley RW, Bersot TP. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E phenotype E3/3. Structure and genetics of an apolipoprotein E3 variant. J Clin Invest. 1989 Apr;83(4):1095-101.

9. Wardell MR, Weisgraber KH, Havekes LM, Rall SC Jr. Apolipoprotein E3-Leiden contains a seven-amino acid insertion that is a tandem repeat of residues 121-127. J Biol Chem. 1989 Dec 15;264(35):21205-10.

10. Smit M, de Knijff P, van der Kooij-Meijs E, Groenendijk C, van den Maagdenberg AM, Gevers Leuven JA, Stalenhoef AF, Stuyt PM, Frants RR, Havekes LM.Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia. The

E2(lys146----gln) variant results in a dominant mode of inheritance. J Lipid Res. 1990 Jan;31(1):45-53.

11. Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G, Forte TM, Ordovas JM, Zech LA, Brewer HB Jr. Familial apolipoprotein E deficiency. J Clin Invest. 1986 Nov;78(5):1206-19.

12. Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Felber BK, Pavlakis G, Zannis VI.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. 1987 Feb 15;262(5):2310-5.

13. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. Cell. 1992 Oct 16;71(2):343-53.

14. Zannis, V. I.; Just, P. W.; Breslow, J. L. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am. J. Hum. Genet.* 33: 11-24, 1981.

15. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? Ann Hum Genet. 1999 Jul; 63(Pt 4):301-10.

Παράρτημα Β

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΣΤΟΧΟΥ, ΜΟΡΙΩΝ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ HDL, SR-BI

Identification of the Molecular Target of Small Molecule Inhibitors of HDL Receptor SR-BI Activity[†,‡,§]

Thomas J. F. Nieland,[||,⊥] Jared T. Shaw,[▽] Firoz A. Jaipuri,[▽] Jay L. Duffner,[▽] Angela N. Koehler,[▽] Sotirios Banakos,[||] Vassilis I. Zannis,[○] Tomas Kirchhausen,[#] and Monty Krieger*[,||]

Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Room 68-483, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139, Broad Institute of Harvard and MIT, 7 Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02142, Department of Chemistry, University of California, One Shields Avenue, Davis, California 95616, Section of Molecular Genetics, Whitaker Cardiovascular Institute and Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts 02118, and Department of Cell Biology, Harvard Medical School and Immune Disease Institute, 200 Longwood Avenue, Boston, Massachusetts 02115

Received June 29, 2007; Revised Manuscript Received September 14, 2007

ABSTRACT: Scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), controls high-density lipoprotein (HDL) metabolism by mediating cellular selective uptake of lipids from HDL without the concomitant degradation of the lipoprotein particle. We previously identified in a high-throughput chemical screen of intact cells five compounds (BLT-1−5) that inhibit SR-BI-dependent lipid transport from HDL, but do not block HDL binding to SR-BI on the cell surface. Although these BLTs are widely used to examine the diverse functions of SR-BI, their direct target(s), SR-BI itself or some other component of the SR-BI pathway, has not been identified. Here we show that SR-BI in the context of a membrane lipid environment is the target of BLT-1, -3, -4, and -5. The analysis using intact cells and an in vitro system of purified SR-BI reconstituted into liposomes was aided by information derived from structure−activity relationship (SAR) analysis of the most potent of these BLTs, the thiosemicarbazone BLT-1. We found that the sulfur atom of BLT-1 was crucially important for its inhibitory activity, because changing it to an oxygen atom resulted in the isostructural, but essentially inactive, semicarbazone derivative BLT-1sc. SAR analysis also established the importance of BLT-1's hydrophobic tail. BLTs and their corresponding inactive compounds can be used to explore the mechanism and function of SR-BI-mediated selective lipid uptake in diverse mammalian experimental models. Consequently, BLTs may help determine the therapeutic potential of SR-BI-targeted pharmaceutical drugs.

The HDL[1] receptor SR-BI plays a key role in lipoprotein metabolism (*1*). The physiological functions of SR-BI have been most thoroughly studied in mice, because of the facile genetic manipulation of gene expression in this species. In mice, SR-BI is expressed in hepatocytes, where it controls plasma lipoprotein metabolism and the structure and composition of plasma HDL particles, and in steroidogenic cells, into which it delivers cholesterol for storage and steroidogenesis (*2*−*4*). Hepatic expression of SR-BI protects against atherosclerosis in several murine models (*5*−*11*), and SR-BI-deficiency in homozygous null knockout mice results in female infertility (*12*, *13*) and defects in red blood cell maturation (*14*). Although it seems likely that SR-BI plays similarly important roles in lipoprotein metabolism in other mammals, including humans, direct experimental evidence is very limited.

[†] This work was supported by National Institutes of Health Grants HL52212 to M.K., HL48739 to V.I.Z., and AIO63430 to T.K. and by funds to J.T.S. from the Broad Institute Scientific Planning and Resources Committee (SPARC) and Amgen. The contribution of J.L.D. and A.N.K. on this project has been funded in part with funds from the National Cancer Institute's Initiative for Chemical Genetics, National Institutes of Health, under Contract N01-CO-12400.

[‡] The content of this paper does not necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Service, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the U.S. Government.

[§] T.J.F.N. participated in the conception of the study and the design and interpretation of all experiments and designed, performed, and interpreted all SR-BI assays, as well as cowrote the paper. J.T.S. and F.A.J. were primarily responsible for the design of the SAR approach and were responsible for the synthesis and characterization of novel derivatives of BLT-1. J.L.D. and A.N.K. designed, performed, and interpreted the surface plasmon resonance binding experiments. S.B. and V.I.Z. prepared the tetracycline-inducible SR-BI-t1 vector, and S.B. generated HEK293S GnTI(−) cells that stably express inducible SR-BI-t1 and purified SR-BI-t1 protein. T.K. was involved in the interpretation of liposome experiments in the early phase of this work. M.K. participated in the conception of the study and the design and interpretation of all experiments and cowrote the paper.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: (617) 253-6793. Fax: (617) 258-5851. E-mail: krieger@mit.edu.

[||] Massachusetts Institute of Technology.

[⊥] Current address: Broad Institute of Harvard and MIT.

[▽] Broad Institute of Harvard and MIT and University of California.

[○] Boston University School of Medicine.

[#] Harvard Medical School and Immune Disease Institute.

[1] Abbreviations: [^{3}H]CE, [^{3}H]cholesteryl oleyl ether; DiI, 1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; HDL, high-density lipoprotein; SR-BI, scavenger receptor, class B, type I; LDL, low-density lipoprotein; CE, cholesteryl ester or cholesteryl ether; apoA, apolipoprotein A; BLT, blocker of lipid transport; IC_{50}, concentration of the compounds that caused a half-maximal decrease in (selective) uptake.

10.1021/bi701277x CCC: $40.75 © 2008 American Chemical Society
Published on Web 12/08/2007

SR-BI mediates the binding of HDL to cells and the subsequent efficient transfer into the cells of cholesteryl esters from HDL's core, but not the net transfer of HDL's protein or most of the lipid components of its outer shell. This two-step process, called selective lipid uptake (*1*, *2*, *15*−*17*), occurs on the cell surface and does not require endocytosis (*18*−*25*), and thus markedly differs from the receptor-mediated endocytic delivery of lipoprotein cholesterol to cells via the LDL receptor (*26*). SR-BI also mediates bidirectional movement of unesterified cholesterol between cells and lipoproteins (*27*−*29*). The detailed molecular mechanism underlying SR-BI-mediated lipid transport into and out of cells is not understood.

We previously employed a high-throughput screen in intact cells to identify small-molecule inhibitors of SR-BI-dependent selective lipid uptake (*30*). Five compounds discovered in this screen were named BLT-1 to BLT-5, because they block lipid transport mediated by SR-BI. This includes inhibition of selective uptake from HDL of either cholesteryl ethers (nonhydrolyzable analogues of cholesterol esters) or DiI (a fluorescent lipid), as well as efflux of unesterified cholesterol from cells to HDL (*30*, *31*). The BLTs were the first pharmacologic tools identified that can directly probe the physiologic functions of the SR-BI pathway and can be used to provide additional insight into the molecular mechanisms underlying SR-BI-mediated HDL binding and lipid transport. Indeed, BLTs have been used to study a plethora of SR-BI activities (*24*, *32*−*42*), including viral infection (*43*−*47*), vitamin E transport (*48*), lipoprotein endocytosis (*21*, *23*, *49*), and lipid transport mediated by ABC superfamily proteins (*31*).

Unexpectedly, inhibition of SR-BI-mediated lipid transport by BLTs is accompanied by an increase in SR-BI's binding affinity for HDL (*30*). The novel effects of BLTs on SR-BI's activity suggest that they may help probe the mechanism of SR-BI-mediated lipid transport. However, the potential utility of the BLTs was limited, because their direct molecular target(s) had not been identified. One candidate is SR-BI itself, but because the BLTs were identified in an intact cell-based screen, other cellular components required for normal SR-BI activity were also possible targets. Indeed, a comparison of the effects of the BLTs on cholesterol efflux mediated by SR-BI and the structurally distinct transporter ABCA1 (*50*) raised the possibility that the direct target of BLT-4 might not be SR-BI (*31*).

In the current study we identify the molecular target of BLT-1 by using a two-step approach. BLT-1, a thiosemicarbazone (Figure 1A), was chosen for detailed analysis because it is the most potent of the BLTs. First, we performed structure−activity relationship (SAR) analysis to gain insight into the chemical features underlying the nanomolar potency by which BLT-1 blocks cellular lipid transport. This highlighted a key feature of BLT-1 required for its inhibitory activity—the sulfur of the thiosemicarbazone moiety. Substitution of an oxygen atom for this sulfur resulted in an inactive semicarbazone derivative, BLT-1sc (Figure 2B). Second, we showed that BLT-1, but not BLT-1sc, inhibits selective uptake mediated by virtually homogenously pure, epitope-tagged SR-BI reconstituted into phosphotidylcholine/cholesterol liposomes. BLT-3, -4, and -5 also inhibited SR-BI-mediated selective lipid uptake in the reconstituted liposomes. Thus, SR-BI in the context of a membrane lipid environment is the molecular target of these four chemically distinct BLTs, suggesting that these BLTs can be used to explore further the molecular mechanisms underlying SR-BI function.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Compounds. Compounds tested for their effects on SR-BI activity were obtained either by synthesis (see below) or by purchase from Oakwood Products, Inc. (1-decyl-2-thiourea), Karl Industries, Sapon Laboratories Division (*n*-octylurea), and Sigma/Aldrich (BLT-1nac, catalog number R397857, and 1-decanethiol). BLT-4 was either obtained from Chembridge Corp. (San Diego) or synthesized as previously described (*31*). The remaining compounds, which were purchased from Chembridge Corp., were (Chembridge ID numbers in parentheses) compounds **1**−**9** (5136875, 5136871, 5234224, 5234954, 5554654, 8016115, 8016113, 5153618, 5136957, respectively), BLT-1 (5234221), BLT-2 (5234225), BLT-3 (5106931), BLT-4 (5109586), BLT-5 (5117098), and BLT-1sc (5152562). All compounds synthesized specifically for this study (BLT-1, ref *31* and see below) were prepared as stock solutions in DMSO (25−500 mM), and their identities and purities were verified by LC−MS and NMR analysis. The purities of all compounds purchased from Chembridge Corp. and BLT-1nac were verified by LC−MS. In addition, we selected several of the compounds we deemed most critical for this study (BLT-1, BLT-1ncp7, 1-decyl-2-thiourea, BLT-1sc, compound **5**, compound **9**) and determined whether there were any signs of degradation under conditions of our standard assays: a 3 h incubation in assay medium (Ham's F12/0.5% DMSO/25 mM HEPES, pH 7.4) containing 0.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma catalog no. A3059; see below). After this treatment the compounds were extracted from the medium with ethyl acetate and characterized by LC−MS. The only masses we could identify in the LC−MS trace were those of the unmodified compounds of interest as well as those of the solvent (DMSO, Ham's F12, albumin-associated molecules). Although it is possible that some degradation of the compounds of interest could have produced products hidden under peaks of the assay medium components, we conclude that the compounds remain stable under the conditions used for the receptor assays in this study.

Synthesis and Chemical Characterization of Chemical Compounds. (A) BLT-1NMe [2-(2-Hexylcyclopentylidene)-N-methylhydrazinecarbothioamide]. To a solution of 2-*n*-hexylcyclopentanone (0.200 g, 1.19 mmol) in ethanol (4 mL) at room temperature were added 4-methylthiosemicarbazide (0.125 g, 1.19 mmol) and 6 M hydrochloric acid (0.22 mL, 1.31 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux for 2 h. It was cooled to room temperature and neutralized with aqueous sodium bicarbonate. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 × 50 mL). The combined organic layer was washed with water (30 mL) and saturated aqueous (satd aq) NaCl (30 mL) and dried over sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product purified by flash column chromatography on silica gel using 5% MeOH/CH_2Cl_2. The desired product was obtained as a light yellow solid (0.155 g, 0.608 mmol, 51%): ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.27 (s, 1H), 7.43 (br s, 1H), 3.18 (d, 3H, J = 4.8 Hz), 2.41−2.31 (m, 2H), 2.24−2.12 (m, 1H), 2.07−1.87 (m, 2H), 1.75−1.56 (m,

2H), 1.38−1.26 (m, 10H), 0.862 (t, 3H, J = 6.3 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 178.7, 163.8, 44.6, 32.1, 31.7, 31.2, 31.0, 29.3, 27.9, 27.5, 22.7, 22.6, 14.0; RP-LC−MS (gradient/column/ionization) m/z for $C_{13}H_{25}N_3S$ $(M + H)^+$ 256.0, t_R = 1.36 min. LC−MS data for all synthesized compounds were collected using a 5:95 to 95:5 acetonitrile/water (0.01% formic acid) solvent gradient on an XTerra MS C18 3.5 μm, 4.6 × 30 mm column using electrospray ionization.

(B) BLT-1SMe [Methyl 2-(2-Hexylcyclopentylidene)hydrazinecarbimidothioate]. To a solution of 2-*n*-hexylcyclopentanone (0.200 g, 1.09 mmol) in ethanol (4 mL) at room temperature were added *S*-methylisothiosemicarbazide hydroiodide (0.277 g, 1.19 mmol) and 6 M hydrochloric acid (0.22 mL, 1.31 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux for 4 h. It was cooled to room temperature and neutralized with aqueous sodium bicarbonate. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 × 50 mL). The combined organic layer was washed with water (30 mL) and satd aq NaCl (30 mL) and dried over sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product purified by flash column chromatography on silica gel using 5% MeOH/CH_2Cl_2. The desired product was obtained as a light yellow solid (0.181 g, 0.709 mmol, 60%): ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.19 (br s, 2H), 2.75−2.65 (m, 1H), 2.49−2.37 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.06−1.96 (m, 1H), 1.88−1.79 (m, 2H), 1.67−1.52 (m, 1H), 1.42−1.29 (m, 10H), 0.887 (t, 3H, J = 6.3 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 176.8, 158.0, 44.8, 32.9, 32.1, 31.7, 30.0, 29.7, 28.1, 22.9, 14.3, 12.8; RP-LC−MS (gradient/column/ionization) m/z for $C_{13}H_{25}N_3S$ $(M + H)^+$ 255.9, t_R = 1.40 min.

(C) BLT-1ncp7 (Octanal Thiosemicarbazone). To a solution of octanal (0.200 g, 1.56 mmol) in 95% ethanol (4 mL) at room temperature was added thiosemicarbazide (0.142 g, 1.56 mmol). The reaction mixture was sonicated for 1 h, and the solvent was removed under reduced pressure to yield a white solid (0.298 g, 1.48 mmol, 95%): ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.53 (s, 1H), 7.28 (t, 1H, J = 6 Hz), 7.09 (br s, 1H), 6.31 (br s, 1H), 2.24−2.31 (m, 2H), 1.48−1.59 (m, 2H), 1.25−1.34 (m, 8H), 0.90 (t, 3H, J = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 178.1, 148.3, 32.1, 31.6, 29.0, 28.9, 26.1, 22.5, 14.0; RP-LC−MS (gradient/column/ionization) m/z for $C_9H_{19}N_3S$ $(M + H)^+$ 202.0, t_R = 1.60 min.

(D) BLT-1ncp9 (Decanal Thiosemicarbazone). To a solution of decanal (0.200 g, 1.28 mmol) in 95% ethanol (4 mL) at room temperature was added thiosemicarbazide (0.117 g, 1.28 mmol). The reaction mixture was sonicated for 1 h, and the solvent was removed under reduced pressure to yield a white solid (0.271 g, 1.18 mmol, 92%): ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.89 (s, 1H), 7.33 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 7.09 (br s, 1H), 6.41 (br s, 1H), 2.22−2.29 (m, 2H), 1.49−1.57 (m, 2H), 1.25−1.32 (m, 12H), 0.89 (t, 3H, J = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 178.2, 148.6, 32.2, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 26.1, 22.6, 14.0; RP-LC−MS (gradient/column/ionization) m/z for $C_{11}H_{23}N_3S$ $(M + H)^+$ 230.0, t_R = 1.81 min.

(E) BLT-1ncp11 (Dodecanal Thiosemicarbazone). To a solution of dodecanal (0.200 g, 1.09 mmol) in 95% ethanol (4 mL) at room temperature was added thiosemicarbazide (0.099 g, 1.09 mmol). The reaction mixture was sonicated for 1 h, and the solvent was removed under reduced pressure to yield a white solid (0.268 g, 1.04 mmol, 96%): ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.70 (s, 1H), 7.30 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 7.09 (br s, 1H), 6.36 (br s, 1H), 2.23−2.30 (m, 2H), 1.48−1.58 (m, 2H), 1.24−1.34 (m, 16H), 0.89 (t, 3H, J = 6.6 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 178.3, 148.4, 32.1, 31.9, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 26.1, 22.6, 14.0; RP-LC−MS (gradient/column/ionization) m/z for $C_{13}H_{27}N_3S$ $(M + H)^+$ 258.1, t_R = 1.98 min.

Lipoproteins and Cells. Human HDL (density of ∼1.09−1.16 g/mL) was isolated and labeled as previously described (*2*, *51*−*54*). Its protein components were labeled with ^{125}I (^{125}I-HDL), and it was labeled with lipids, either [^{3}H]-cholesteryl oleyl ether ([^{3}H]CE; [^{3}H]CE-HDL) or DiI (1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (from Molecular Probes); DiI-HDL). Most intact cell assays were performed using control LDL receptor-deficient Chinese hamster ovary (CHO) cells that express low levels of endogenous SR-BI (ldlA-7) (*55*) or ldlA-7 cells stably transfected to express high levels of wild-type murine SR-BI (ldlA[mSR-BI]) (*2*). These cells were maintained in culture medium A (Ham's F12 supplemented with 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 units/mL penicillin/50 μg/mL streptomycin, and, for ldlA[mSR-BI] cells only, 0.25 mg/mL G418) (*51*). HEK293 cells were used for experiments involving transient transfection of plasmids encoding wild-type and cysteine mutant forms (see below) of mSR-BI. For these experiments, the HEK293 cells were plated in poly-L-lysine-coated 24-well dishes at a density of 150 000 cells/well in 0.5 mL/well of medium B (DMEM/Ham's F12 (1:1 from Gibco BRL) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 50 units/mL penicillin/50 μg/mL streptomycin). On day 1, the cells were washed once with medium C (medium B containing 5% fetal bovine serum) and then transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions with the following expression vectors: (1) wild-type murine SR-BI (mSR-BI) in pcDNA1 (*2*); (2) a mutant mSR-BI in which both Cys^{462} and Cys^{470} were replaced by serines (mSR-BI (CC → SS); double cysteine mutant) in pcDNA3 (*53*), or (3) a pcDNA3 (Invitrogen) control vector (no cDNA insert). SR-BI activity assays in these transiently transfected cells were performed on day 3 as described below. All experiments with cells were conducted at 37 °C.

Cellular Lipid Transport and ^{125}I-HDL Binding Assays. As previously described, assays of the uptake of [^{3}H]CE from [^{3}H]CE-HDL or uptake of DiI from DiI-HDL, as well as ^{125}I-HDL binding, were performed using ldlA[mSR-BI] cells and control untransfected ldlA-7 cells (*2*, *27*, *30*, *52*) or using transiently transfected HEK293 cells generated as described above. For [^{3}H]CE uptake and ^{125}I-HDL binding assays in ldlA[mSR-BI] and ldlA-7 cells, cells were seeded in 24-well plates on day 0 in medium A at a density of 75 000 cells/well. In the case of HEK293 cells, cells were plated on day 0 at a density of 150 000 cells per well and transfected on day 1 (see above), and [^{3}H]CE-HDL uptake and ^{125}I-HDL binding assays were performed on day 3. For DiI-HDL uptake assays, ldlA[mSR-BI] cells and ldlA-7 cells were seeded on day 0 in medium A in 96-well plates (Costar, black with a clear bottom) at a density of 35 000 cells/well in the same medium. Assays were performed on day 2. On the day of the assay, the cells were washed twice with Ham's F12 without supplements and then preincubated for 1 h at 37 °C with compounds at the indicated concentrations in assay

medium (Ham's F12/0.5% DMSO/25 mM HEPES, pH 7.4) containing 0.5% (w/v) BSA (Sigma catalog no. A3059). The cells were then incubated for 2 h (ldlA[mSR-BI] and ldlA-7 cells) or 4 h (HEK293 cells) with the same concentrations of small molecules together with 10 μg of protein/mL of ^{125}I-HDL (binding), [^{3}H]CE-HDL, or DiI-HDL (uptake). In experiments using radiolabeled lipoproteins, the cells were washed (4 °C) one time with PBS supplemented with 1 mM $CaCl_2$ and 1 mM $MgCl_2$ (PBS+) and 0.5% (w/v) BSA and two times with PBS+ without BSA. Cellular accumulation of [^{3}H]CE was measured following isopropyl alcohol extraction, and binding of ^{125}I-HDL was determined as previously described (*2*). To determine cellular uptake of DiI after incubation with DiI-HDL, we placed the cells on ice and washed them three times with ice-cold PBS+ containing 0.5% (w/v) BSA and then measured cellular DiI using a Molecular Devices SpectraMax GEMINI XS fluorescence plate reader or an Analyst Plate fluorescence plate reader (Molecular Devices). For all experiments, the values presented were normalized so that 100% of the control value represents receptor-specific activity in ldlA[mSR-BI] or HEK293[SR-BI] cells in the presence of 0.5% DMSO without compounds, and 0% activity is defined as the activity determined in ldlA-7 or control pcDNA3-transfected HEK293 cells. The amounts of cell-associated [^{3}H]CE are expressed as the equivalent amount of [^{3}H]CE-HDL protein (ng) (*56*). For experiments using HEK293 cells transiently transfected with either the wild-type (wt) mSR-BI or the CC → SS double cysteine mutant, values (ng of protein (equivalent)/mg of cell protein) determined in the absence of BLT-1 of [^{3}H]CE-HDL selective uptake were as follows: SR-BI (wt), 2526; SR-BI (CC → SS), 2762; pcDNA3 empty vector control, 448. Values (ng of protein/mg of cell protein) determined in the absence of BLT-1 of ^{125}I-HDL binding were as follows SR-BI (wt) cells, 234; SR-BI (CC → SS) 257; pcDNA3 empty vector control 46. Results averaged from two independent experiments are presented. In the DiI-HDL assay, background nonspecific uptake was determined by inclusion of a 40-fold excess (400 μg of protein/mL) of unlabeled HDL in the media (*2*). Data analysis was performed using Graphpad Prism4 software from GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. The IC_{50} values are the concentrations of the compounds that caused a half-maximal inhibition of SR-BI-mediated lipid transport. Selective uptake data presented are representative of results from three or more independent experiments, unless otherwise indicated. DiI-HDL data presented are averaged results from two or three experiments. We observed that the inhibition of cellular SR-BI activity by BLT-1−BLT-5 is fully reversible after a 3−6 h wash out of each of the compounds as measured in the 2 h cellular DiI-HDL uptake assay (data not shown). In addition, the IC_{50} and extent of inhibition by these BLTs are similar for experiments in which the cells are preincubated for 1 h with the compounds prior to addition of the HDL ligand (standard assay in which cells are incubated with DiI-HDL for 2 h) and for those in which the BLTs are only added essentially simultaneously with the HDL ligand (no preincubation) (not shown).

Lipid Transport and ^{125}I-HDL Binding Assays in Liposomes. Purification of mSR-BI-t1 with uniform, truncated N-linked oligosaccharide chains: We have previously described the isolation of HEK293S cells that overexpress a C-terminally epitope-tagged murine SR-BI (mSR-BI-t1) and the single-step immunoaffinity purification of mSR-BI-t1 to virtual homogeneity (*57*). The detergent-solubilized purified protein can be reconstituted into liposomes that exhibit SR-BI-mediated ^{125}I-HDL binding and selective uptake of [^{3}H]-CE from [^{3}H]CE-HDL (*57*). We used a similar approach in this study to examine the potential direct effects of SR-BI lipid transport inhibitors on this receptor in liposomes, but with one key difference (S. Banakos, P. J. Reeves, V. Zannis, and M. Krieger, manuscript in preparation). mSR-BI-t1 was expressed in an *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-defective HEK293S derivative, HEK293S GnTI(−), that generates a glycoprotein with uniform, truncated N-linked oligosaccharide chains under the control of a tetracycline inducible promoter (*58*, *59*). A clone of HEK293S GnTI(−) cells expressing high levels of mSR-BI-t1 was isolated and grown to mass culture in a Celligen Plus bioreactor (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) and the receptor purified to homogeneity as previously described (*57*). mSR-BI-t1 with truncated N-linked chains was reconstituted into liposomes as previously described (*57*, *60*, *61*). Briefly, 20 μg of mSR-BI-t1 (or an equivalent volume of protein-free buffer to generate control liposomes that are devoid of mSR-BI-t1) was reconstituted into liposomes by acetone precipitation. mSR-BI-t1 liposomes were washed once by resuspension of the acetone precipitate in protein-free assay medium followed by centrifugation (48000*g*) for 25 min at 4 °C. The pellet was first reconstituted in assay medium without protein, and then an equal volume of assay medium with 1% fatty acid free (FAF) BSA (Sigma catalog no. A6003) was added to yield liposomes at a nominal final concentration of ∼18 ng of mSR-BI-t1/mL. In each reaction, 30 μL of the liposome preparation was preincubated with 30 μL of assay medium containing 0.5% FAF BSA and DMSO with the indicated compounds (0.5% DMSO final concentration) for 60 min at 37 °C. Subsequently, 20 μL of [^{3}H]CE-HDL (five replicates per sample) or ^{125}I-HDL (four replicates per sample) was added to a final concentration of 10 μg of protein/mL. Incubation was continued for 4 h at 37 °C, and then selective uptake of [^{3}H]CE into liposomes and binding of ^{125}I-HDL to liposomes were determined using the previously described filter binding assays (*57*). SR-BI specific activity was determined by subtracting uptake and binding values in control liposomes from those in mSR-BI-t1-containing liposomes, and selective uptake values were determined as described above for cellular assays. A value 100% of the control value represents receptor-specific activity in mSR-BI-t1 containing liposomes in the presence of 0.5% DMSO without compounds, and 0% of the control value represents selective uptake in control liposomes devoid of mSR-BI-t1. Representative results from two or three independent experiments are shown.

Surface Plasmon Resonance Analysis of Compound Binding to BSA. BSA is included in the assays reported here to reduce nonspecific interactions of lipoproteins with cells or liposomes. Albumin can bind a variety of small molecules (reviewed in ref *62*); thus, binding to BSA might reduce the bioavailability of the compounds tested here, depending on the concentration of a compound and its affinity for binding to BSA. To calculate the value of the amount of free compound required to inhibit SR-BI activity by 50% [IC_{50}-(corrected)] and compare it to the uncorrected value (IC_{50}),

we determined the affinity of binding of compounds to BSA using surface plasmon resonance analysis with a Biacore S51 instrument, as previously described for binding studies using human serum albumin (*63*−*65*). BSA was diluted to 115 μg/mL in 10 mM acetate buffer, pH 5.0, and immobilized on a Biacore CM5 sensor chip using standard 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride/*N*-hydroxysuccinimide coupling chemistry. On each sensor detection spot, 5000−9000 response units (RU; corresponding to ~1 pg of protein/mm^2 sensor area) of BSA was immobilized.

The Biacore binding assay was conducted two or three times, depending on the compound, in Biacore buffer, TBS-P, pH 7.4 (25 mM Tris−HCl, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.005% (v/v) P20 surfactant (Biacore AB, catalog number BR-100-54)) containing either 2% (v/v) DMSO or 5% (v/v) DMSO. The compounds were tested using 4-fold serial dilutions, starting at either 50 μM (to cover the lower concentration range, with 781 nM being the lowest dose tested) or 200 μM (to cover the 50−200 μM range). The compounds were then sequentially injected with an association time of 60 s, a dissociation time of 60 s, a flow rate of 30 μL/min, and an assay temperature of 25 °C. Naproxen and warfarin (381 nM to 200 μM, both from Sigma) were used as positive BSA binding controls. Data were analyzed using Scrubber software (University of Utah's Center for Biomolecular Interaction Analysis, http://www.cores.utah.edu/interaction/). Data were double reference subtracted and normalized so that the theoretical maximum response from the sensor equals 100 RU for each compound. Equilibrium binding affinities assuming binding to a single site on BSA were determined using GraphPad Prism 4 with a nonlinear regression, one-site binding model. The K_d values (μM) were as follows: BLT-1, 161 ± 41; BLT-1sc, 80 ± 26; BLT-2, 113 ± 34; compound **3**, 43 ± 2; compound **4**, 33 ± 4; compound **6**, 72 ± 3; compound **7**, 177 ± 8; and compound **8**, 95 ± 4. None of the other compounds were found to bind to BSA up to a concentration of 200 μM, the highest concentration tested in these experiments. The K_d values for compound binding to BSA were used to calculate the concentrations of compound "free" (not bound to BSA) in the incubation media, and these free concentrations were then used to calculate IC_{50}(corrected) values. The free concentrations of compounds, $[A]_{free}$, were calculated using eq 2 from the total concentration ($[A]_0$), the total concentration of BSA ($[B]_0$ = 75.76 μM), the concentration of the 1:1 complex formed between BSA and compound ([AB]; calculated using eq 4, which was derived from eqs 1 and 3)), and the equilibrium dissociation constant for compound/BSA binding as measured by surface plasmon resonance (K_d) assuming a 1:1 binding ratio and no competition for albumin binding with other components of the assay media.

$$[B]_{free} = [B]_0 - [AB] \quad (1)$$

$$[A]_{free} = [A]_0 - [AB] \quad (2)$$

$$K_d = \frac{[A]_{free}[B]_{free}}{[AB]} \quad (3)$$

$$0 = [A]_0[B]_0 - [AB]([A]_0 + [B]_0 + K_d) + [AB]^2 \quad (4)$$

The corrected IC_{50} for inhibition of DiI-HDL uptake was calculated (see above) by replacing the total concentration, $[A]_0$, by the free concentration of the compound, $[A]_{free}$. The corrected (and uncorrected) values for DiI-HDL uptake (nM, with the exception of BLT-1sc) were as follows BLT-1, 15 (21); BLT-1sc, >500 μM (>500 μM); compound **3**, 110 (320); compound **4**, 72 (240); compound **6**, 33 (69); compound **7**, 116 (220); and compound **8**, 400 (720). The corrected value for the IC_{50} for BLT-2 is 220 nM, which is based on the uncorrected value of 350 nM reported by Nieland et al. (*30*). IC_{50} values (nM) for BLT-1 for [^{3}H]CE-HDL selective uptake were 39 (57) in cells and 68 (98) in liposomes. The effects of the correction are relatively small and do not influence the conclusions. Therefore, we have presented the uncorrected values throughout this paper.

Data Analysis. The statistical significance of differences was determined by two-tailed unpaired Student's *t* test using Graphpad Prism 4 software. Average values are presented ± the standard error of the mean. Differences were considered significant for $P < 0.05$. Hill coefficients were calculated using Graphpad Prism 4 software. cLogP values were determined using ChemBioDraw Ultra version 11 from Cambridgesoft.com.

RESULTS

Here we first present the results of SAR analysis of BLT-1 for the inhibition of mSR-BI and then use the results to help identify the molecular target of BLT-1 in cells.

SAR Analysis of BLT-1 in Cultured Cells. Our SAR analysis of BLT-1 has focused on three features of its structure: the cyclopentyl group, the alkyl chain, and the thiosemicarbazone group (Figure 1A). To assess the ability of BLT-1 and its derivatives and analogues to inhibit lipid transport mediated by SR-BI in cultured cells, we pretreated (1 h, 37 °C) stably transfected cells expressing mSR-BI, ldlA-[mSR-BI] (*2*), or their untransfected essentially SR-BI-negative controls, ldlA-7 (*55*), with varying concentrations of the compounds. We then used standard assays (2 h incubations, 37 °C), conducted in the presence of the same concentrations of compounds to measure SR-BI-mediated (i) cellular uptake of the lipophilic dye DiI from DiI-HDL (10 μg of protein/mL) or (ii) selective uptake of [^{3}H]CE from [^{3}H]CE-HDL (10 μg of protein/mL) and (iii) receptor-specific binding of ^{125}I-HDL (10 μg of protein/mL), which was used to calculate selective lipid uptake. Inhibitory activity was characterized by both potency (concentrations of the compounds that caused a half-maximal inhibition of SR-BI-mediated lipid transport, IC_{50}) and the extent of inhibition (absolute reduction in SR-BI-mediated lipid transport). The principle differences in inhibitory activity we observed for different compounds were altered IC_{50} values; unless indicated otherwise, the extent of inhibition for a compound with IC_{50} < 500 μM was comparable to that for the positive control (e.g., BLT-1).

(A) Cyclopentyl Group. We initiated our SAR analysis of BLT-1 by altering its cyclopentane moiety. Figure 1C shows that when the cyclopentane was removed by substitution of three of its methylenes with two protons (no cyclopentane (ncp), compound BLT-1ncp7; Figure 1B) inhibition of SR-

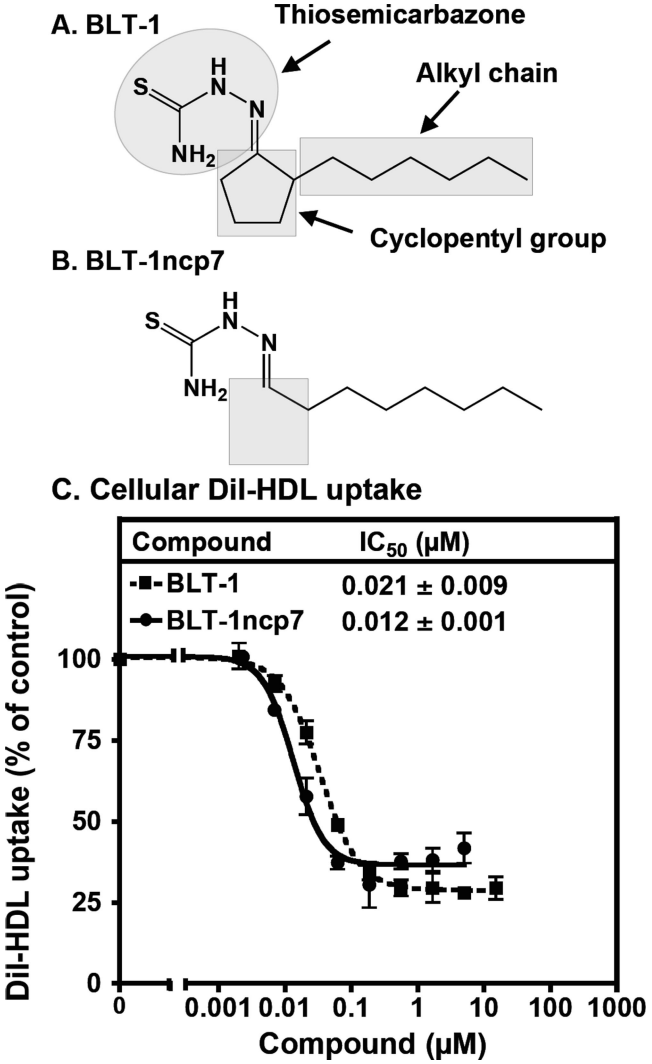


FIGURE 1: Effect of BLT-1's cyclopentane on inhibition of SR-BI-mediated lipid transport. Cells (ldlA[mSR-BI] and ldlA-7) were preincubated with BLT-1 (A) or BLT-1ncp (B) at the indicated concentrations for 1 h at 37 °C in medium containing 0.5% (v/v) DMSO. The cells were then incubated for an additional 2 h with the same medium containing DiI-HDL (10 μg of protein/mL) in the presence of the same concentrations of BLT-1 or BLT-1ncp. The cells were then washed, and the amount of DiI incorporated into the cells was measured using a fluorescence plate reader. The values were normalized so that 100% of the control represents receptor-specific DiI-HDL uptake by ldlA[mSR-BI] cells without compounds and 0% activity is defined as the activity determined in ldlA[mSR-BI] cells in the presence of a 40-fold excess of unlabeled HDL. Panel C shows for BLT-1 (squares) one of four representative experiments in which the values were determined from duplicate incubations and for BLT-1ncp (circles) the average of two independent experiments. IC_{50} values ± the standard error of the mean are derived from an average of four (BLT-1) or two (BLT-1ncp) experiments using nonlinear regression analysis. In ldlA[mSR-BI] cells, DiI-HDL uptake in the presence of excess of unlabeled HDL was 23% of that without the unlabeled HDL.

BI-mediated uptake of DiI-HDL was similar (IC_{50} = 12 ± 1 nM) to that with unmodified BLT-1 (IC_{50} = 21 ± 9 nM). It is noteworthy that BLT-1 has a chiral carbon and our synthetic method produces a racemic mixture; it is possible that only one of the two sterioisomers may be active. In contrast, BLT-1ncp7 does not have a chiral center. The cyclopentyl group is clearly not required for the inhibitory activity of BLT-1.

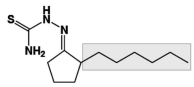
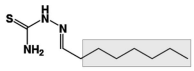
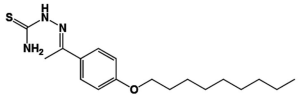
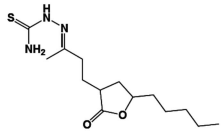
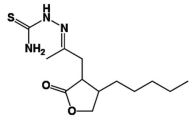
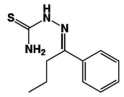
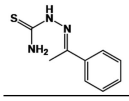
Table 1: SAR Analysis of the Alkyl Chain of BLT-1

Compound	IC_{50} (μM)[a]
BLT-1	0.021 ± 0.009
BLT-1ncp7	0.012 ± 0.001
BLT-1ncp9	0.011 ± 0.003
BLT-1ncp11	0.038 ± 0.006
BLT-2	0.35 ± 0.18
Compound 1	0.047 ± 0.026
BLT-1nac	36.2 ± 6.5
Compound 2	45.2 ± 23
Compound 3	0.33 ± 0.19
Compound 4	0.28 ± 0.1

[a] SAR analysis of BLT-1 derivatives for DiI-HDL uptake was performed in ldlA[mSR-BI] and ldlA-7 cells as described for Figure 1. IC_{50} values are derived from an average of four (BLT-1), three (compound **1**), or two (all other compounds) experiments using nonlinear regression analysis.

(B) Alkyl Chain. We next determined the influence of the length of the alkyl chains on the activities of BLT-1 and its BLT-1ncp7 derivative (no cyclopentane) using the DiI-HDL assay (Table 1). When the length of the alkyl chain of BLT-1ncp7 (IC_{50} = 12 ± 1 nM) was extended by two (BLT-1ncp9) or four (BLT-1ncp11) methylenes, there was little change in potency or extent of inhibition (IC_{50} = 11 ± 3 and 38 ± 6 nM, respectively). The addition of a methyl group on the imine carbon of BLT-1ncp9 also had very little effect (compound **1**; IC_{50} = 47 ± 26 nM), which was to be expected because there was little difference in activity between the compounds with (BLT-1) and without (BLT-1ncp7) the cyclopentane ring. In contrast, shortening the alkyl chain had a dramatic, negative effect on the potency of BLT-1 (Table 1). Substitution of the six-carbon-long alkyl chain of BLT-1 with a proton (no alkyl chain (nac), compound BLT-1nac) resulted in an approximately 1700-fold increase in the IC_{50} (36.2 ± 6.5 μM) but no substantial change in the extent of maximal inhibition. Another derivative that similarly lacks the six-carbon alkyl chain, in which the cyclopentane group is substituted by a cyclohexane group

Table 2: SAR Analysis of the Alkyl Chain of BLT-1

Compound	IC_{50} (μM)[a]
 BLT-1	0.021 ± 0.009
 BLT-1ncp7	0.012 ± 0.001
 Compound 5	0.013 ± 0.003
 Compound 6	0.11 ± 0.08
 Compound 7	0.29 ± 0.18
 Compound 8	0.75 ± 0.32
 Compound 9	3.6 ± 0.5

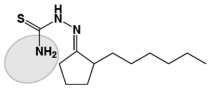
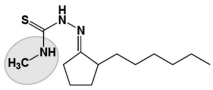
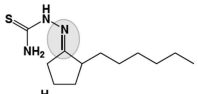
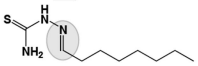
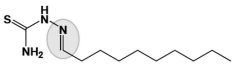
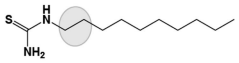
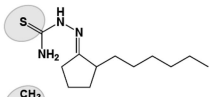
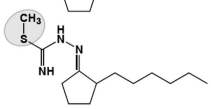
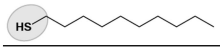
[a] IC_{50} values are based on results from an average of four (BLT-1), three (compound **5**), or two (all other compounds) experiments using DiI-HDL and ldlA[mSR-BI] and ldlA-7 cells as described in Figure 1.

(compound **2**; $IC_{50} = 45.2 \pm 23.0$ μM), was almost as potent as BLT-1nac. This reinforces the conclusion from Figure 1 that the cyclopentane group per se does not substantially influence activity. Addition of a C_4 alkyl chain to the cyclohexane ring of compound **2** enhanced its potency ~100-fold (compound **3**; $IC_{50} = 0.33 \pm 0.19$ μM). Addition of a cyclohexene to compound **2** had an effect (compound **4**; $IC_{50} = 0.28 \pm 0.1$ 9μM) similar to that of adding a C_4 alkyl chain. Because the cyclopentane or cyclohexane rings do not appear to influence inhibitory activity, we conclude that the greater potencies (lower IC_{50} values) of BLT-1ncp7 and BLT-1 compared to compounds **3** and **4** can be attributed to their longer alkyl chains.

We have previously shown that introducing an oxygen atom (ether bond) into the middle of the alkyl chain of BLT-1 increased the IC_{50} by about 17-fold (BLT-2; $IC_{50} = 0.35 \pm 0.18$ μM, Table 1; see ref *30*). Table 2 shows the IC_{50} values for other derivatives of BLT-1 or BLT-1ncp7. In general, addition of bulky cycloester groups or replacement of flexible linear alkyl chains with rings reduced the potency of the inhibitors. Thus, a flexible alkyl chain substantially contributes to the remarkably high potency of BLT-1, with optimal chain lengths of ~6−8 carbons. Although compounds BLT-1nac and **2** were less potent than BLT-1 (Table 1), they were nevertheless moderately potent inhibitors, indicating that the thiosemicarbazone portion of BLT-1 plays a key role in determining its activity.

(C) Thiosemicarbazone. We next modified various features of the thiosemicarbazone of either BLT-1 or BLT-1ncp7 and examined the consequences on inhibition of SR-BI-mediated lipid transport from DiI-HDL or [^{3}H]CE-HDL (Table 3 and Figure 2).

Table 3: SAR Analysis of the Thiosemicarbazone Group of BLT-1

Compound	IC_{50} (μM)[a,c]
Primary amine ([^{3}H]CE-HDL assay)[b]	
 BLT-1	0.057 ± 0.015
 BLT-1NMe	0.16 ± 0.005
Imino group (DiI-HDL assay)	
 BLT-1	0.021 ± 0.009
 BLT-1ncp7	0.012 ± 0.001
 BLT-1ncp9	0.011 ± 0.003
 1-decyl-2-thiourea	1.9 ± 0.3
Thiocarbonyl group ([^{3}H]CE-HDL assay)[b]	
 BLT-1	0.057 ± 0.015
 BLT-1SMe	82 ± 42
 1-decanethiol	> 250

[a] IC_{50} values were determined using either the DiI-HDL or [^{3}H]CE-HDL assays as indicated. [b] SR-BI specific values determined in the absence of compound for the [^{3}H]CE-HDL assays were as follows: selective [^{3}H]CE uptake, 4480 ng of protein (equivalent)/mg of cell protein; ^{125}I-HDL binding, 153 ng of protein/mg of cell protein. [c] Values are averages from six (BLT-1), five (BLT-1NMe), four (BLT-1), three (compound **5**), or two (all other compounds) experiments.

(1) Primary Amine. Conversion of the primary amine on the thiosemicarbazone of BLT-1 into a secondary amine by the addition of a single methyl group decreased the potency only by about 3-fold (BLT-1NMe; $IC_{50} = 0.16 \pm 0.05$ μM, [^{3}H]CE-HDL assay (Table 3)). There was also a relatively small increase in IC_{50} caused by the analogous methylation of BLT-1ncp7 (BLT-1ncp7NMe; single experiment, data not shown). Thus, the primary amine is not essential for robust inhibitory activity.

(2) Imino Group. As described above, compounds BLT-1ncp7 and BLT-1ncp9, which do not have cyclopentanes, are potent inhibitors with activities comparable to that of BLT-1 (Figure 1, Table 1). Their thiourea analogue, 1-decyl-2-thiourea, in which the imino group is replaced with two methylenes (Table 3), is about 100-fold less potent ($IC_{50} = 1.9 \pm 0.3$ μM) in the DiI-HDL assay. This indicates that the imino group substantially contributes to the inhibitory activity, even though it is apparently not essential for activity

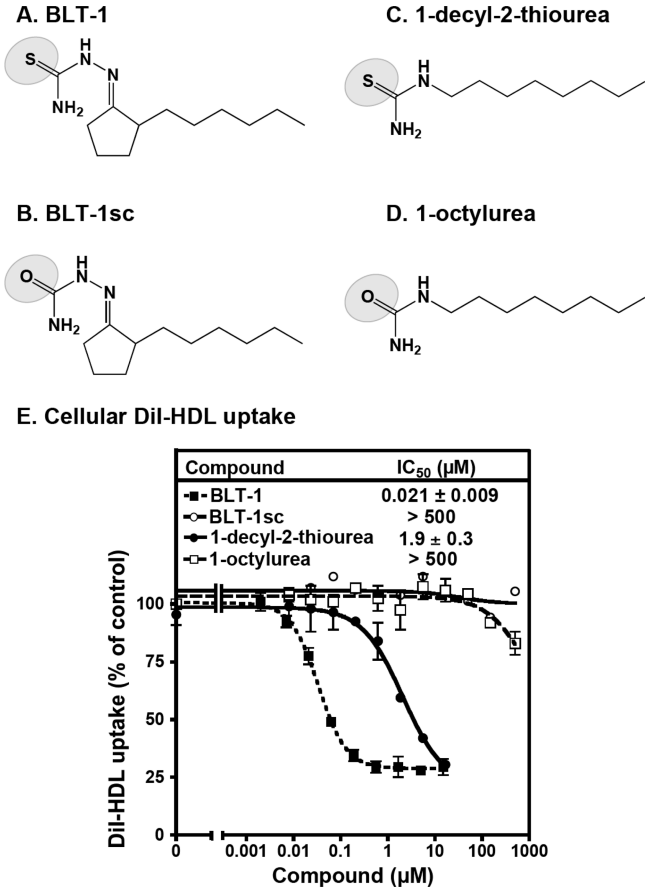


FIGURE 2: Effects of replacing the thiocarbonyl group's sulfur with oxygen on BLT-1's or 1-decyl-2-thiourea's inhibition of SR-BI-mediated lipid transport. The effects of BLT-1 (A, E, solid squares), BLT-1sc (B, E, open circles), 1-decyl-2-thiourea (C, E, solid circles), and 1-octylurea (D, E, open squares) on SR-BI-dependent uptake of DiI from DiI-HDL (10 μg of protein/mL) in ldlA[mSR-BI] and ldlA-7 cells were determined as described in Figure 1. IC_{50} values were derived from an average of four experiments with BLT-1 or two experiments with the other compounds.

(see below for examples of compounds with essentially complete loss of activity).

(3) Thiocarbonyl. The sulfur atom in the thiocarbonyl of thiosemicarbazones may be capable of forming disulfide bonds with the sulfhydryl groups in cysteines (*66*). At least two of the eight cysteines in murine SR-BI, Cys^{462} and Cys^{470}, are potentially available to form disulfide bonds with the sulfur in the thiocarbonyl group of BLT-1, because they do not appear to be engaged in inter- or intramolecular disulfide bonds. Indeed, they are at least partially fatty acylated (*53*). Thus, if SR-BI were the direct target of BLT-1 (see below), its ability to be inhibited by BLT-1 might depend on free sulfhydryl groups. We therefore examined the ability of BLT-1 to inhibit the selective uptake of [^{3}H]CE from [^{3}H]-CE-HDL by HEK293 cells transiently expressing either wild-type mSR-BI or a mutant mSR-BI in which both Cys^{462} and Cys^{470} were replaced by serines (mSR-BI (CC $\rightarrow$ SS); double cysteine mutant). Previous studies established that the mutant mSR-BI (CC $\rightarrow$ SS) exhibits normal HDL binding and selective lipid uptake activities (*53*). BLT-1 at a concentration of 1 μM was equally effective in inhibiting selective lipid uptake mediated by the wild-type (17.0 $\pm$ 3.5% of the control without BLT-1) and double cysteine mutant (26.0 $\pm$ 2.1% of the control, $P = 0.07$) receptors. Thus, formation of a disulfide bond between BLT-1 and the side chain of either Cys^{462} or Cys^{470} is not required for potent inhibition of mSR-BI by BLT-1. The disulfide bonding pattern of the additional six cysteine residues in the extracellular domain of mSR-BI has not yet been reported; however, by analogy with a report of the disulfide pattern for SR-BI's homologue CD36 (*67*), it is possible that all six of these cysteines participate in intramolecular disulfide bonds. Future studies will be required to determine whether any of these other cysteines in mSR-BI are available to form potential disulfide bonds with the sulfur atom in the thiosemicarbazone group of BLT-1.

When the thiocarbonyl of BLT-1 ($IC_{50} = 0.057 \pm 0.015$ μM in the [^{3}H]CE-HDL assay**)** was converted to a methyl thioether (BLT-1SMe; $IC_{50} = 82 \pm 42$ μM, [^{3}H]CE-HDL assay), there was a ~1440-fold increase in the IC_{50} (Table 3). The activity of the less potent inhibitor BLT-1nac (no alkyl chain, $IC_{50} = 38.6 \pm 9.1$ μM in the [^{3}H]CE-HDL assay) was also substantially reduced by this modification (data not shown). Not surprisingly, 1-decanethiol exhibited virtually no inhibitory activity. These results raise the possibility that either formation of a disulfide bond between the sulfur of BLT-1's thiosemicarbazone and its target or nucleophilic attack of the target on the thiocarbonyl carbon might, in part, contribute to BLT-1's tight binding to its target, and thus its high potency. Nevertheless, the significant residual inhibitory activity of BLT-1SMe relative to virtually inactive derivatives with $IC_{50} > 500$ μM (see below) indicates that neither of these two potential mechanisms is absolutely essential for at least some inhibitory activity.

When the sulfur atom in the thiocarbonyl of BLT-1 was replaced with an oxygen atom, forming the semicarbazone BLT-1sc (Figure 2A,B), there was a >20000-fold loss of potency ($IC_{50} > 500$ μM) in both the DiI-HDL (Figure 2E) and [^{3}H]CE-HDL (see below) assays. Similarly, 1-octylurea was also almost inactive (Figure 2D, $IC_{50} > 500$ μM, 20% of the maximal BLT-1 inhibition at 500 μM; compare to 1-decyl-2-thiourea (Figure 2C), $IC_{50} = 1.9 \pm 0.3$ μM). Because BLT-1sc has virtually no inhibitory activity yet its structure and hydrophobicity (cLogP = 4.48) are almost identical to that of BLT-1 (cLogP = 4.41), it seems unlikely that the principle mechanism by which BLT-1 inhibits SR-BI-mediated lipid transport is its nonspecific partition into membranes and consequent alteration of membrane biophysical properties. BLT-1sc can be used as an isostructural, negative control for further analysis of the mechanism by which BLT-1 inhibits SR-BI activity.

SR-BI is the Target of BLT-1. Because BLT-1 was identified in an intact cell-based screening assay (*30*), a critical unresolved issue regarding its mechanism was the identification of its molecular target. Candidate targets include SR-BI itself as well as other potential, but as yet unknown, cellular components that may be required for SR-BI activity in intact cells. To determine whether SR-BI is BLT-1's target, we examined the ability of BLT-1 and BLT-1sc to inhibit selective lipid uptake mediated by homogeneous, purified, epitope-tagged receptor (mSR-BI-t1) protein reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol (PC) liposomes (*57*). Figure 3 shows that BLT-1 can inhibit SR-BI-dependent selective uptake of [^{3}H]CE from [^{3}H]CE-HDL by mSR-BI-t1-containing liposomes and that the IC_{50} values for BLT-1 were essentially identical in cells (Figure 3A, 0.057

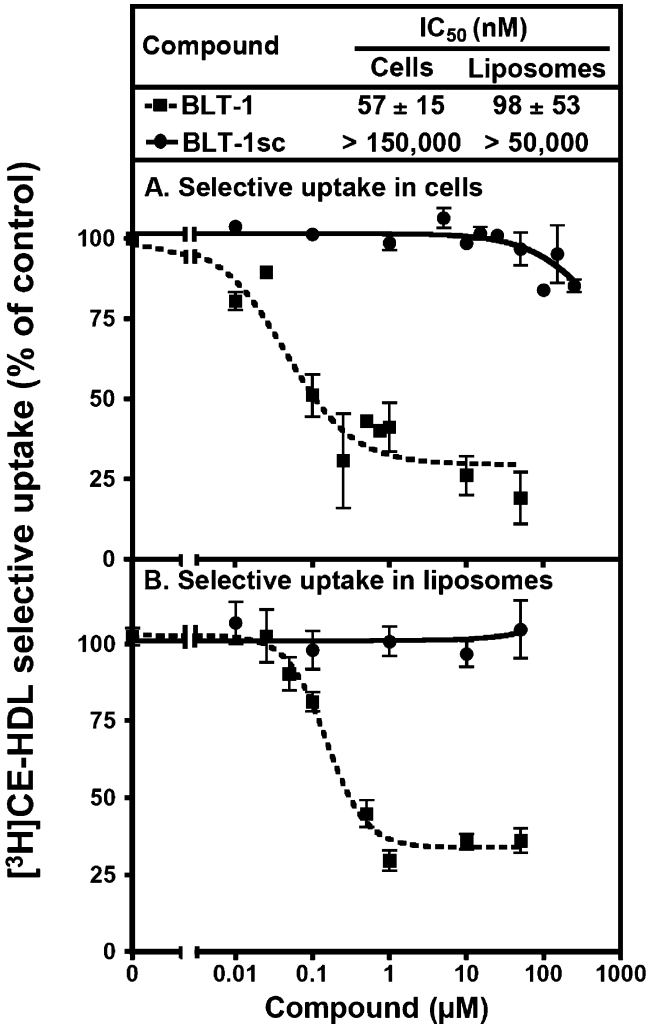
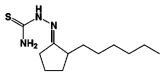
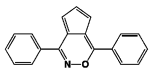
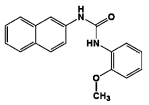
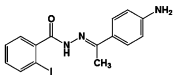


FIGURE 3: Effects of BLT-1 and BLT-1sc on SR-BI activity in cells and liposomes. (A) Cellular SR-BI-mediated selective uptake of [^{3}H]CE from [^{3}H]CE-HDL (10 μg of protein/mL) using ldlA-[mSR-BI] and ldlA7 cells measured in the presence of the indicated concentrations of BLT-1 (average of six independent experiments) or BLT-1sc (average of four independent experiments) was determined as described in Figure 2 for DiI-HDL. (B) SR-BI-t1-containing liposomes or control liposomes (devoid of SR-BI-t1) were preincubated for 1 h at 37 °C in medium containing the indicated concentrations of BLT-1 or BLT-1sc, followed by incubation with 10 μg of protein/mL of either [^{3}H]CE-HDL or ^{125}I-HDL for 4 h at 37 °C in the presence of the same concentrations of compounds. These incubation media with and without the compounds contained 0.5% (v/v) DMSO. For liposome assays, 100% of the control value represents receptor specific activity in SR-BI-t1 containing liposomes without compounds and 0% of the control value represents background selective uptake in control liposomes. SR-BI specific values (ng of protein/mg of cell protein) for cells determined in the absence of compounds were ([^{3}H]CE-HDL selective uptake) 4480 ng and (^{125}I-HDL binding) 153 ng. For liposomes the values (ng of protein/sample) of selective uptake and binding were (mSR-BI-t1 containing liposomes) 159 and 46 and (control, protein-free liposomes) 44 and 5.

$\pm$ 0.015 μM ($n = 6$)) and liposomes (Figure 3B, 0.098 $\pm$ 0.053 μM ($n = 2$)). BLT-1 did not affect low background [^{3}H]CE uptake observed in control liposomes prepared without mSR-BI-t1. The inhibitory effect is specific, because the negative control BLT-1sc did not inhibit SR-BI activity in the reconstituted system (Figure 3). Because the IC_{50} values for cells and liposomes were nearly identical, we conclude that the molecular target of BLT-1 for SR-BI-dependent selective uptake in cells is SR-BI itself in the context of a lipid environment.

Table 4: Effects of BLTs on SR-BI Activity in Cells and Liposomes

Compound	IC_{50} (μM)[a-c] Cells	Liposomes
 BLT-1	0.057 ± 0.015[d]	0.098 ± 0.053[e]
 BLT-3	2.3 ± 1.5[d]	2.0 ± 0.1[e]
 BLT-4	3.9 ± 0.8[d]	4.7 ± 3.3[f]
 BLT-5	13.8 ± 8.5[g]	25.9 ± 1.7[e]

[a] The effect of BLTs on SR-BI-mediated selective uptake of [^{3}H]CE from [^{3}H]CE-HDL in cells and liposomes was determined as described in Figure 3. [b] IC_{50} values for cells for BLT-3, BLT-4, and BLT-5 were from ref *30*. [c] No statistical differences were found beween IC_{50} values for selective uptake in cells compared to liposomes (*P* values: BLT-1, 0.0976; BLT-3, 0.7975; BLT-4, 0.5681; BLT-5, 0.1169). [d] $n = 6$. [e] $n = 2$. [f] $n = 3$. [g] $n = 5$.

Identification of the Target of BLT-3, BLT-4, and BLT-5. Table 4 shows that each of these BLTs can inhibit SR-BI-mediated selective uptake of [^{3}H]CE from [^{3}H]CE-HDL in reconstituted liposomes with IC_{50} values for inhibition essentially identical to those previously determined in intact cell assays (*30*). As was the case for BLT-1 and BLT-1sc, no effect of any of these three BLTs was seen in control liposomes lacking mSR-BI-t1 protein. Thus, we tentatively conclude that SR-BI in the context of a lipid environment is also the molecular target of these BLTs.

DISCUSSION

High-throughput screening in intact cells of chemically diverse small-molecule compound libraries to identify inhibitors and activators of biological systems provides powerful reagents for the analyses of the functions and mechanisms of action of these systems (*68*). We previously employed such a screen of intact cells to identify small-molecule inhibitors, called BLTs, of lipid transport mediated by the HDL receptor SR-BI (*30*). This receptor plays a key role in lipoprotein metabolism and is a potential target for the prevention and treatment of cardiovascular disease (*1*). Unfortunately, identification of the molecular target(s) of compounds identified in such screens remains problematic. Previously, we have shown that the target of BLTs resides in cells and is not in the HDL ligand (*30*). In the current study we identified SR-BI in the context of a lipid environment as a molecular target of BLT-1, BLT-3, BLT-4, and BLT-5 using an in vitro system of purified SR-BI reconstituted into liposomes and information derived from SAR analysis of the most potent of these BLTs, the thiosemicarbazone BLT-1.

We first used SAR analysis to characterize the features of BLT-1 that contribute to its high (nanomolar IC_{50}) potency.

BLT-1 comprises three distinct structural features: cyclopentyl, linear alkyl, and thiosemicarbazone moieties. The linear alkyl chain substantially contributes to the potency of BLT-1, with an optimal chain length of ~6−8 carbons and substantially reduced potency for shorter chains of reduced lipophilicity. Indeed, there was a linear relationship between the hydrophobicity (calculated partition coefficient between octanol and water, cLogP) and log(IC_{50}) (negative slope) for all 15 thiosemicarbazones tested (not shown), indicating that hydrophobicity played a significant role in determining a compound's potency. For example, the addition of a relatively hydrophilic oxygen in the middle of the alkyl chain of BLT-1 (cLogP = 4.41) to form BLT-2 (cLogP = 2.88 was accompanied by an approximately 17-fold increase in IC_{50} (reduced potency). It is possible that the alkyl chain facilitates interaction of BLT-1 with the plasma membrane, increasing its effective concentration near the receptor, or that it interacts with lipid binding sites on the receptor that normally participate in the lipid transport process. The cyclopentyl group has little influence on activity. The sulfur in the thiosemicarbazone is essential for activity. Because the isostructural semicarbazone derivative of BLT-1, called BLT-1sc (sulfur replaced by oxygen, Figures 2 and 3), is essentially completely inactive (IC_{50} >20000-fold higher than that of BLT-1) even though its hydrophobicity is almost identical to that of BLT-1 (cLogP of 4.48 vs 4.41), it seems unlikely that the principle mechanism by which BLT-1 inhibits SR-BI-mediated lipid transport is its nonspecific partition into membranes and consequent alteration of membrane biophysical properties.

The precise mechanism by which the thiosemicarbazone of BLT-1 mediates inhibition of SR-BI remains to be established. Thiosemicarbazone-based drugs are used for diverse molecular targets to treat a wide variety of unrelated diseases and targets (e.g., tuberculosis (*69*−*71*), tumor proliferation (*72*−*74*), ribonucleotide reductase (*75*, *76*), trypanosomal cystein proteases (*77*)). Mechanisms of actions ascribed to thiosemicarbazone-based drugs include (a) chelation of transition metals (*78*) (b) disulfide bond formation (thiosemicarbazone's sulfur and a sulfhydryl on the target) (*66*), and (c) covalent bond formation (nucleophilic attack of the target on the thiocarbonyl carbon of the thiosemicarbazone) (*77*). Each of these may contribute to BLT-1's high potency, because BLT-1 derivatives that cannot participate in such interactions were significantly less potent than BLT-1. Regardless of the detailed role of the thiosemicarbazone, BLT-1 and many of its derivatives inhibited SR-BI-mediated lipid uptake with Hill coefficients that were very close to unity, indicating that inhibitor cooperativity did not contribute to the activity of these compounds. Additional studies will be required to establish the mechanism of BLT-1 inhibition. Nevertheless, identification of BLT-1sc as an inactive, isostructural, semicarbazone derivative of BLT-1 permitted us to use it as a negative control in studies designed to identify the molecular target of BLT-1.

In previous studies we established that a C-terminally epitope-tagged variant of murine SR-BI, mSR-BI-t1, could be purified to homogeneity, could be reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes, and could mediate the binding of HDL and selective uptake of its lipids with an affinity similar to that of SR-BI in intact cells (*42*, *57*). In this study we showed that BLT-1 can inhibit selective lipid uptake mediated by purified mSR-BI-t1 in liposomes with a potency (IC_{50}) similar to that seen in intact cells. BLT-1sc, the semicarbazone derivative inactive in intact cell assays, was also inactive in the purified receptor lipid transport assay. Thus, we conclude that SR-BI in the context of a lipid environment is the molecular target of BLT-1, their interaction resulting in inhibition of receptor-mediated selective lipid uptake in cells. It is noteworthy that in the initial SAR studies reported here we were unable to identify a derivative or variant of BLT-1 that exhibited substantially greater potency than BLT-1 itself.

Three other blockers of SR-BI-mediated lipid transport identified by intact cell screening (*30*)—BLT-3, BLT-4, and BLT-5 (Table 4)—were also shown to inhibit SR-BI-mediated lipid uptake in reconstituted liposomes with potencies similar to those in intact cells. Thus, even though we have not conducted SAR analysis of these inhibitors to generate corresponding negative control compounds, it seems reasonable to conclude that SR-BI is also a molecular target of these compounds in the context of a lipid environment. In the case of BLT-4, this was somewhat unexpected. This compound can inhibit, with essentially identical potencies, cholesterol transport out of cells mediated by two distinct surface transporters, SR-BI and ABCA1 (*31*). BLT-4 appears to be a pan-ABC superfamily inhibitor (for example, it also inhibits efflux of toxic substances from *Staphylococcus aureus* by the ABC pump NorA (*79*)). Similar to BLT-4, another ABC superfamily inhibitor, glyburide (sometimes called glybenclamide), can inhibit SR-BI and ABCA1 with low, but similar, potencies (*31*). It thus seemed likely that these drugs would indirectly, perhaps through an unidentified ABC protein, rather than directly, inhibit SR-BI. The results reported here suggest that SR-BI is a molecular target of BLT-4 and this direct interaction is likely to account for some, if not all, of the inhibition of SR-BI selective uptake activity in cells by BLT-4.

In summary, we identified SR-BI in the context of a lipid environment as a direct molecular target of BLTs in studies aided by SAR analysis of BLT-1. The results of the SAR analysis can be used in the future to direct the synthesis of BLT-1 derivatives (and semicarbazone inactive controls) for additional structure/function analysis of SR-BI. For example, covalently cross-linkable derivatives of BLT-1 might be used to help map the binding site(s) of BLT-1 on SR-BI and identify amino acid residues or regions in the protein important for the activity of the receptor. Identification of such sites, together with ongoing mutational analysis of SR-BI and biophysical studies, may help elucidate the distinctive, but as yet very poorly defined, mechanism by which SR-BI mediates lipid transport between HDL and cells. Also, it is possible that BLT-1 or other BLTs may be adapted for in vivo studies of the role of SR-BI in HDL metabolism (*80*, *81*), especially in species in which genetic modification of SR-BI activity (e.g., loss or gain of function) is difficult or impossible (rabbit, rat, dog, nonhuman primate). Such studies could significantly contribute to our understanding of the in vivo function of SR-BI and possible help direct future development of pharmaceuticals that target SR-BI and its role in atherosclerosis, cardiovascular disease, and female infertility (*1*).

ACKNOWLEDGMENT

We thank Marsha Penman and Shangze Xu for technical assistance in lipoprotein purification and labeling and purification of SR-BI-t1 protein for liposome assays and DiI-HDL assays. We also thank Drs. Steve Lippard and Lee Latimer for helpful discussions and Dr. Ralph Mazitschek for LC−MS analyses used to examine the stability of compounds.

REFERENCES

1. Rigotti, A., Miettinen, H. E., and Krieger, M. (2003) The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues, *Endocr. Rev. 24*, 357−387.
2. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor, *Science 271*, 518−520.
3. Temel, R. E., Trigatti, B., DeMattos, R. B., Azhar, S., Krieger, M., and 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*, 13600−13605.
4. Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M., and 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*, 984−995.
5. Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Glick, J. M., Krieger, M., and 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, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 20*, 721−727.
6. Trigatti, B., Rayburn, H., Vinals, M., Braun, A., Miettinen, H., Penman, M., Hertz, M., Schrenzel, M., Amigo, L., Rigotti, A., and Krieger, M. (1999) Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96*, 9322−9327.
7. Covey, S. D., Krieger, M., Wang, W., Penman, M., and Trigatti, B. L. (2003) Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 23*, 1589−1594.
8. Ueda, Y., Gong, E., Royer, L., Cooper, P. N., Francone, O. L., and Rubin, E. M. (2000) Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics, *J. Biol. Chem. 275*, 20368−20373.
9. Van Eck, M., Twisk, J., Hoekstra, M., Van Rij, B. T., Van der Lans, C. A., Bos, I. S., Kruijt, J. K., Kuipers, F., and Van Berkel, T. J. (2003) Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver, *J. Biol. Chem. 278*, 23699−23705.
10. Zhang, S., Picard, M. H., Vasile, E., Zhu, Y., Raffai, R. L., Weisgraber, K. H., and Krieger, M. (2005) Diet-induced occlusive coronary atherosclerosis, myocardial infarction, cardiac dysfunction, and premature death in scavenger receptor class B type I-deficient, hypomorphic apolipoprotein ER61 mice, *Circulation 111*, 3457−3464.
11. Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., and 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*, 32920−32926.
12. Miettinen, H. E., Rayburn, H., and Krieger, M. (2001) Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice, *J. Clin. Invest. 108*, 1717−1722.
13. Yesilaltay, A., Morales, M. G., Amigo, L., Zanlungo, S., Rigotti, A., Karackattu, S. L., Donahee, M. H., Kozarsky, K. F., and Krieger, M. (2006) Effects of hepatic expression of the high-density lipoprotein receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and female fertility, *Endocrinology 147*, 1577−1588.
14. Holm, T. M., Braun, A., Trigatti, B. L., Brugnara, C., Sakamoto, M., Krieger, M., and Andrews, N. C. (2002) Failure of red blood cell maturation in mice with defects in the high-density lipoprotein receptor SR-BI, *Blood 99*, 1817−1824.
15. Stein, Y., Dabach, Y., Hollander, G., Halperin, G., and Stein, O. (1983) Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether, *Biochim. Biophys. Acta 752*, 98−105.
16. Glass, C., Pittman, R. C., Weinstein, D. B., and Steinberg, D. (1983) Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80*, 5435−5439.
17. Zannis, V. I., Chroni, A., and Krieger, M. (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *J. Mol. Med. 84*, 276−294.
18. Wustner, D., Mondal, M., Huang, A., and Maxfield, F. R. (2004) Different transport routes for high density lipoprotein and its associated free sterol in polarized hepatic cells, *J. Lipid Res. 45*, 427−437.
19. Reaven, E., Chen, Y. D., Spicher, M., and Azhar, S. (1984) Morphological evidence that high density lipoproteins are not internalized by steroid-producing cells during in situ organ perfusion, *J. Clin. Invest. 74*, 1384−1397.
20. Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M. A., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Williams, D. L. (2004) Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein, *Mol. Biol. Cell 15*, 384−396.
21. Nieland, T. J., Ehrlich, M., Krieger, M., and Kirchhausen, T. (2005) Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI, *Biochim. Biophys. Acta 1734*, 44−51.
22. Harder, C. J., Vassiliou, G., McBride, H. M., and McPherson, R. (2006) Hepatic SR-BI-mediated cholesteryl ester selective uptake occurs with unaltered efficiency in the absence of cellular energy, *J. Lipid Res. 47*, 492−503.
23. Sun, B., Eckhardt, E. R., Shetty, S., van der Westhuyzen, D. R., and Webb, N. R. (2006) Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts, *J. Lipid Res. 47*, 1700−1713.
24. Zhang, Y., Ahmed, A. M., McFarlane, N., Capone, C., Boreham, D. R., Truant, R., Igdoura, S. A., and Trigatti, B. L. (2007) Regulation of SR-BI-mediated selective lipid uptake in Chinese hamster ovary-derived cells by protein kinase signaling pathways, *J. Lipid Res. 48*, 405−416.
25. Eckhardt, E. R., Cai, L., Sun, B., Webb, N. R., and van der Westhuyzen, D. R. (2004) High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII, *J. Biol. Chem. 279*, 14372−14381.
26. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science 232*, 34−47.
27. Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. L., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J. B., and Tall, A. R. (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux, *J. Biol. Chem. 272*, 20982−20985.
28. Jian, B., de la Llera-Moya, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M. C., Swaney, J. B., Tall, A. R., and Rothblat, G. H. (1998) Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors, *J. Biol. Chem. 273*, 5599−5606.
29. Yancey, P. G., de la Llera-Moya, M., Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S. M., Connelly, M. A., Johnson, W. J., Williams, D. L., and Rothblat, G. H. (2000) High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI, *J. Biol. Chem. 275*, 36596−36604.
30. Nieland, T. J., Penman, M., Dori, L., Krieger, M., and Kirchhausen, T. (2002) Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 15422−15427.
31. Nieland, T. J., Chroni, A., Fitzgerald, M. L., Maliga, Z., Zannis, V. I., Kirchhausen, T., and Krieger, M. (2004) Cross-inhibition of SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol transport by the small molecules BLT-4 and glyburide, *J. Lipid Res. 45*, 1256−1265.
32. Duong, M., Collins, H. L., Jin, W., Zanotti, I., Favari, E., and Rothblat, G. H. (2006) Relative contributions of ABCA1 and SR-BI to cholesterol efflux to serum from fibroblasts and macrophages, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 26*, 541−547.
33. Sahoo, D., Darlington, Y. F., Pop, D., Williams, D. L., and Connelly, M. A. (2007) Scavenger receptor class B Type I (SR-BI) assembles into detergent-sensitive dimers and tetramers, *Biochim. Biophys. Acta 1771*, 807−817.
34. O'Connell, B. J., Denis, M., and Genest, J. (2004) Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells, *Circulation 110*, 2881−2888.

35. van der Westhuyzen, D. R., Cai, L., de Beer, M. C., and de Beer, F. C. (2005) Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I, *J. Biol. Chem. 280*, 35890−35895.
36. Zimetti, F., Weibel, G. K., Duong, M., and Rothblat, G. H. (2006) Measurement of cholesterol bidirectional flux between cells and lipoproteins, *J. Lipid Res. 47*, 605−613.
37. Ortegren, U., Yin, L., Ost, A., Karlsson, H., Nystrom, F. H., and Stralfors, P. (2006) Separation and characterization of caveolae subclasses in the plasma membrane of primary adipocytes; segregation of specific proteins and functions, *FEBS J. 273*, 3381−3392.
38. Marsche, G., Frank, S., Raynes, J. G., Kozarsky, K. F., Sattler, W., and Malle, E. (2007) The lipidation status of acute-phase protein serum amyloid A determines cholesterol mobilization via scavenger receptor class B, type I, *Biochem. J. 402*, 117−124.
39. Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., Andre, M., Portugal, H., Jourdheuil-Rahmani, D., Amiot, M. J., Lairon, D., and Borel, P. (2005) Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI), *Biochem. J. 387*, 455−461.
40. Osada, Y., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. (2006) Involvement of mitogen-activated protein kinases in class B scavenger receptor type I-induced phagocytosis of apoptotic cells, *Exp. Cell Res. 312*, 1820−1830.
41. Nakagawa, A., Shiratsuchi, A., Tsuda, K., and Nakanishi, Y. (2005) In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells, *Mol. Reprod. Dev. 71*, 166−177.
42. Nieland, T. J., Shaw, J., Jaipuri, F. A., Maliga, Z., Duffner, J. L., Koehler, A. N., and Krieger, M. (2007) Influence of HDL-cholesterol elevating drugs on the in vitro activity of the HDL receptor SR-BI, *J. Lipid Res. 48*, 1832−1845.
43. Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op, De, Beeck, A., Dubuisson, J., and Vu-Dac, N. (2005) High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I, *J. Biol. Chem. 280*, 7793−7799.
44. Voisset, C., Op, de Beeck, A., Horellou, P., Dreux, M., Gustot, T., Duverlie, G., Cosset, F. L., Vu-Dac, N., and Dubuisson, J. (2006) High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry, *J. Gen. Virol. 87*, 2577−2581.
45. Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P. E., Keck, Z., Foung, S., Vu-Dac, N., Dubuisson, J., Bartenschlager, R., Lavillette, D., and Cosset, F. L. (2006) High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI, *J. Biol. Chem. 281*, 18285−18295.
46. Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J. M., Lavillette, D., and Cosset, F. L. (2005) An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies, *J. Virol. 79*, 8217−8229.
47. Lavie, M., Voisset, C., Vu-Dac, N., Zurawski, V., Duverlie, G., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (2006) Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system, *Hepatology 44*, 1626−1634.
48. Reboul, E., Klein, A., Bietrix, F., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Schneider, M., Margotat, A., Lagrost, L., Collet, X., and Borel, P. (2006) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte, *J. Biol. Chem. 281*, 4739−4745.
49. Pagler, T. A., Rhode, S., Neuhofer, A., Laggner, H., Strobl, W., Hinterndorfer, C., Volf, I., Pavelka, M., Eckhardt, E. R., van der Westhuyzen, D. R., Schutz, G. J., and Stangl, H. (2006) SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux, *J. Biol. Chem. 281*, 11193−11204.
50. Oram, J. F., and Vaughan, A. M. (2006) ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease, *Circ. Res. 99*, 1031−1043.
51. Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F., and Krieger, M. (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor, *J. Biol. Chem. 269*, 21003−21009.
52. Gu, X., Kozarsky, K., and Krieger, M. (2000) Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor, *J. Biol. Chem. 275*, 29993−30001.
53. Gu, X., Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J., and 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*, 26338−26348; Erratum, *J. Biol. Chem. 273* (52), 35388.
54. Pitas, R. E., Innerarity, T. L., Weinstein, J. N., and Mahley, R. W. (1981) Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy, *Arteriosclerosis 1*, 177−185.
55. Kingsley, D. M., and Krieger, M. (1984) Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein: somatic cell mutants define multiple genes required for expression of surface-receptor activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81*, 5454−5458.
56. Pittman, R. C., Knecht, T. P., Rosenbaum, M. S., and Taylor, C. A., Jr. (1987) A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters, *J. Biol. Chem. 262*, 2443−2450.
57. Liu, B., and Krieger, M. (2002) Highly purified scavenger receptor class B, type I reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes mediates high affinity HDL binding and selective lipid uptake, *J. Biol. Chem. 10*, 10.
58. Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R., and Khorana, H. G. (2002) Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 13419−13424.
59. Reeves, P. J., Kim, J. M., and Khorana, H. G. (2002) Structure and function in rhodopsin: a tetracycline-inducible system in stable mammalian cell lines for high-level expression of opsin mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99*, 13413−13418.
60. Schneider, W. J., Basu, S. K., McPhaul, M. J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1979) Solubilization of the low density lipoprotein receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76*, 5577−5581.
61. Schneider, W. J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1980) Partial purification and characterization of the low density lipoprotein receptor from bovine adrenal cortex, *J. Biol. Chem. 255*, 11442−11447.
62. Peters, T., Jr. (1996) *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, San Diego.
63. Day, Y. S., and Myszka, D. G. (2003) Characterizing a drug's primary binding site on albumin, *J. Pharm. Sci. 92*, 333−343.
64. Frostell-Karlsson, A., Remaeus, A., Roos, H., Andersson, K., Borg, P., Hamalainen, M., and Karlsson, R. (2000) Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels, *J. Med. Chem. 43*, 1986−1992.
65. Rich, R. L., Day, Y. S., Morton, T. A., and Myszka, D. G. (2001) High-resolution and high-throughput protocols for measuring drug/human serum albumin interactions using BIACORE, *Anal. Biochem. 296*, 197−207.
66. Killian, D. M., Hermeling, S., and Chikhale, P. J. (2007) Targeting the cerebrovascular large neutral amino acid transporter (LAT1) isoform using a novel disulfide-based brain drug delivery system, *Drug Delivery 14*, 25−31.
67. Thorne, R. F., Meldrum, C. J., Harris, S. J., Dorahy, D. J., Shafren, D. R., Berndt, M. C., Burns, G. F., and Gibson, P. G. (1997) CD36 forms covalently associated dimers and multimers in platelets and transfected COS-7 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 240*, 812−818.
68. Tochtrop, G. P., and King, R. W. (2004) Target identification strategies in chemical genetics, *Comb. Chem. High Throughput Screening 7*, 677−688.
69. Donovick, R., Pansy, F., Stryker, G., and Bernstein, J. (1950) The chemotherapy of experimental tuberculosis. I. The in vitro activity of thiosemicarbazides, thiosemicarbazones, and related compounds, *J. Bacteriol. 59*, 667−674.
70. Hamre, D., Bernstein, J., and Donovick, R. (1950) The chemotherapy of experimental tuberculosis. II. Thiosemicarbazones and analogues in experimental tuberculosis in the mouse, *J. Bacteriol. 59*, 675−680.
71. Merlani, M. I., Kemertelidze, E. P., Popandopoulos, K., and Men'shova, N. I. (2004) Synthesis from tigogenin and antituberculosis activity of some of the derivatives of 5alpha-ketosteroid hydrazones, *Bioorg. Khim. 30*, 552−557.
72. Lovejoy, D. B., and Richardson, D. R. (2002) Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones

demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells, *Blood 100*, 666−676.
73. Belicchi, Ferrari, M., Bisceglie, F., Pelosi, G., Tarasconi, P., Albertini, R., Dall'Aglio, P. P., Pinelli, S., Bergamo, A., and Sava, G. (2004) Synthesis, characterization and biological activity of copper complexes with pyridoxal thiosemicarbazone derivatives. X-ray crystal structure of three dimeric complexes. *J. Inorg. Biochem. 98*, 301−312.
74. Kalinowski, D. S., and Richardson, D. R. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer, *Pharmacol. Rev. 57*, 547−583.
75. Thelander, L., and Graslund, A. (1983) Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. Destruction of the tyrosine free radical of the enzyme in an oxygen-requiring reaction, *J. Biol. Chem. 258*, 4063−4066.
76. Liu, M. C., Lin, T. S., Cory, J. G., Cory, A. H., and Sartorelli, A. C. (1996) Synthesis and biological activity of 3- and 5-amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, *J. Med. Chem. 39*, 2586−2593.
77. Du, X., Guo, C., Hansell, E., Doyle, P. S., Caffrey, C. R., Holler, T. P., McKerrow, J. H., and Cohen, F. E. (2002) Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain, *J. Med. Chem. 45*, 2695−2707.
78. Sharma, R., Bansal, A., and Nagar, M. (2005) Transition metal complexes of cis-3,7-dimethyl-2,6-octadienthiosemicarbazone: Synthesis, characterization and biocidal studies, *Indian J. Chem., Sect. A 44A*, 2255−2258.
79. Markham, P. N., Westhaus, E., Klyachko, K., Johnson, M. E., and Neyfakh, A. A. (1999) Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of Staphylococcus aureus, *Antimicrob. Agents Chemother. 43*, 2404−2408.
80. Kitayama, K., Nishizawa, T., Abe, K., Wakabayashi, K., Oda, T., Inaba, T., and Amemiya, Y. (2006) Blockade of scavenger receptor class B type I raises high density lipoprotein cholesterol levels but exacerbates atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E deficient mice, *J. Pharm. Pharmacol. 58*, 1629−1638.
81. Nishizawa, T., Kitayama, K., Wakabayashi, K., Yamada, M., Uchiyama, M., Abe, K., Ubukata, N., Inaba, T., Oda, T., and Amemiya, Y. (2007) A novel compound, R-138329, increases plasma HDL cholesterol via inhibition of scavenger receptor BI-mediated selective lipid uptake, *Atherosclerosis 194* (2), 300−308.

BI701277X