

**ADAPTABILIDAD CONFORMACIONAL DE APOLIPOPROTEÍNA A-I EN
COMPLEJOS LIPOPROTEÍCOS DISCOIDALES**



UNLP

Tesis Doctoral

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias

Biológicas

2012

Tesista: Luz Ángela Cuellar

Director: Dr. Horacio Alberto Garda

Co-Director: Dra Laura S. Bakás

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Fac. de Cs. Médicas, UNLP, bajo la dirección del Dr. Horacio Alberto Garda y la co-dirección de la Dra. Laura S Bakás

Agradecimientos

- *Al Dr. Horacio A. Garda*
- *A la Dra. Laura S Bakás*
- *A la Dra. Aminta Mendoza*
- *A los integrantes del laboratorio 7*
- *Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Plata (INIBIOLP).*
- *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).*
- *A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)*
- *Al laboratorio de Resonancia Paramagnética y Electrónica (LEPR), Bogotá, Colombia.*
- *A la Universidad Nacional de la Plata (UNLP)*

A todo el INIBIOLP algunos en formato fasta:

>INIBIOLP

ALEJANDRATRICERRISILVANAANABERNASCONILAURAHERNANDEZN
ORMATEDESCOEDUARDOPRIETOLUCIOVANESSAHERLAXROMINAVA
SQUEZSABINAMATELAURABAKASMARINAGONZALEZJUANTOLEDOJU
ANLAYERENZAVALERIASILVAFLORENCIAREYJORGEPORFIDOMARIN
AIBAÑEZJUANGIROTIOMARRIMOLDIANALAUARARODRIGUEZMABELSA
NTIAGOITUARTEMARCOSDREONHORACIOHERASCARLOSMARRANA
TALIEARNALEVABOSSOLOCRISTINAPALLIANZAROSSANAMONICAPO
LOMARIANAASTIZMAUROALDOELIMAGAGABRIELAFINARELLIFITAEC
T

Dedicatorias

A mi compañía fiel y sincera!!, Mamá y Papá porque a ellos les debo todo lo que soy, a mi familia la cual a pesar de la distancia siempre sentía su amor y presencia, a Aminta a quién le debo lo esencial de mi formación científica, por haberme guiado y acompañado en mis primeros pasos por el laboratorio, cuando apenas era una pequeña estudiante. Por acompañarme en cada etapa del crecimiento, por su ayuda, generosidad, entusiasmo, paciencia y rigor analítico. Por compartir conmigo no sólo horas de trabajo y palabras de aliento, sino por sus cálidas demostraciones de amistad, a Octavio quien se encargaba de robar una sonrisa en cada una de nuestras conversaciones, a mis amigas del Instituto Yanita, Vik, Lau, Val, Romi quienes se encargaron de hacer que siempre me sintiera como en casa!!... por esas largas charlas, juegos (paleta, pelota, Pulita...), cenas y momentos compartidos. A mis compañeras de viaje, salidas culturales y familia Argentina Piky y Lu...sin una familia cerca no hubiese sido posible esta culminación! A Horacio y Silvia por su gran aporte a mi inducción a la vida Argentina social y científica, lo hicieron bastante bien!, lograron que me sintiera una más!.A Tati quien con cada una de sus conversaciones me impulsaba a ser valiente y a saber que siempre de alguna manera se encontraba una solución!!... A todos mis familiares y amigos, los pasados, los presentes y los futuros....

Luz Ángela

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
LMV	vesículas multilamelares
DMPC	Dimiristoil Palmitoil colina
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dntp	desoxinucleotidos trifosfato
DO₆₀₀	densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanometros
FRET	transferencia de energía de foster
ε	Epsilon
FPLC	Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas
FRET	Transferencia de energia entre fluorocromos
GuHCL	Cloruro de guanidinio
IPTG	isopropyl-β-D- 1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
PCR	Reaccion en cadena de la Polimerasa
PDB	Banco de Datos de Proteínas
pI	Punto Isoeléctrico
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Tm	Temperatura de Transición
UV	Ultra violeta
APO A-I	Apolipoproteína A-I

Aminoácidos

Simbolo	Nombre	Código genético
Ala	L-Alanina	GCU, GCC, GCA, GCG
Arg	L-Arginina	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asn	L-Asparagina	AAU, AAC
Asp	L-Ácido aspártico	GAU, GAC
Cys	L-Cisteína	UGU, UGC
Gln	L-Glutamina	CAA, CAG
Glu	L-Ácido glutámico	GAA, GAG
Gly	Glicina	GGU, GGC, GGA, GGG
His	L-Histidina	CAU, CAC
Ile	L-Isoleucina	AUU, AUC, AUA
Leu	L-Leucina	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Lys	L-Lisina	AAA, AAG
Met	L-Metionina	AUG
Phe	L-Fenilalanina	UUU, UUC
Pro	L-Prolina	CCU, CCC, CCA, CCG
Ser	L-Serina	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Thr	L-Treonina	ACU, ACC, ACA, ACG
Trp	L-Triptófano	UGG
Tyr	L-Tirosina	UAU, UAC
Val	L-Valina	GUU, GUC, GUA, GUG

INDICE DE CONTENIDO

Abreviaturas

Listado de Aminoácidos

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y ATROSCLEROSIS.....	11
1.1 Consideraciones Epidemiológicas.....	11
1.2 Aterosclerosis como principal causa de enfermedad cardiovascular...11	
1.3 Desarrollo de la lesión.....	11
1.3.1 Clasificación de lesiones ateroscleróticas.....	14
1.4 Factores de riesgo	15
1.4.1 Hipercolesterolemia.....	15
1.4.2 Hipertencion arterial.....	15
1.4.3 Tabaquismo.....	16
1.4.4 Diabetes mellitus.....	16
1.4.5 Obesidad.....	16
1.4.6 Hormonas sexuales.....	16
1.5 Definición y características de las lipoproteínas plasmáticas.....	17
1.6 Clasificación de las lipoproteínas.....	18
1.7 Síntesis de HDL.....	19
1.8 Rol de la Apo A-I y HDL en el TRC. Generación de HDL discoidales por células.....	20
1.9 Propiedades estructurales de Apo A-I. Flexibilidad y adaptabilidad conformacional.....	20
1.9.1 Tipos de α -hélices anfipáticas en Apo A-I.	21
1.10 Interacción de Apo A-I con superficies lipídicas: HDL esféricas y estado unido a membranas.....	23

1.10.1	La bicapa Lipídica.....	23
1.10.2	Fluidez de la Bicapa	23
1.11	El par central de hélices Y. Independencia funcional y estructural...26	
1.12	Distintas conformaciones de las HDL.	27
1.12.1	HDL- Esfericas.....	28
1.12.2	Pre- β -1- HDL Discoidales.....	29
1.12.3	Pre- β -2- HDL Discoidales	30
1.13	Aspectos fisiopatológicos en el transporte de colesterol.....	30
2.	Objetivos de la tesis	
2.1	Objetivos específicos.....	33
CAPITULO 3. METODOLOGIA		
3.1	Obtención ApoA-I plasmática.....	34
3.2	Obtención de apoA-I Salvaje y mutantes de cisteína a partir de la expresión en cultivos bacterianos.....	35
3.3	Técnicas de biología molecular.....	36
3.3.1	Obtención y Amplificación de vectores para clonación: Plasmidos	
3.4	Tratamiento de bacterias para conferirles competencia.....	38
3.4.1	Transformación.....	38
3.4.2	Construcción de los mutantes de Apo A-I.....	39
3.4.3	Técnicas electroforéticas.....	41
3.4.4	Corte con Acido Formico.....	42
3.5	Marcado de los mutantes con sondas fluorescentes.....	42
3.6	Vesículas lipídicas discoidales conteniendo Apo A-I.....	43
3.7	Técnicas electroforéticas	44
3.7.1	Geles de agarosa.....	45

3.7.2 Geles de poliacrilamida.....	46
3.7.2.1 Sistema de Gel Nativo para Proteínas (PAGE).....	46
3.7.2.2 Sistema de Gel Desnaturalizante (SDS-PAGE).....	47
3.8 Determinación de Proteína.....	47
3.9 Espectroscopia de Resonancia Electronica.....	48
3.10 Fluorescencia.....	53
3.10.1 Anisotropía de fluorescencia.....	57
3.10.2 Transferencia de Energía.....	57
3.10.3 Quenching o apagado de fluorescencia.....	59

CAPITULO 4. RESULTADOS

4.1 Obtención de mutantes de cisteína para determinar distancias intermoleculares en HDL discoidales.....	61
4. 1. 1. Racionalidad de la elección de las mutaciones a realizar.....	61
4. 1. 2. Mutagénesis sitio-dirigida.....	62
4.1.3. Expresión y purificación.....	67
4.1.4 Clivaje con ácido fórmico.....	69
4.2. Caracterización estructural de apoA-I K107C, K133C y K226C.....	70
4.3 Marcación de las proteínas Mutantes.....	76
4. 4. Caracterización estructural y funcional de las proteínas marcadas.....	80
4.4.1. Espectros de emisión de triptófano	81
4.4.2 Capacidad de Apo A-I salvaje y las mutantes marcadas o no marcadas para formar complejos lipoprotéicos.....	81

4.5. Determinación de distancias intermoleculares por transferencia de energía de resonancia (FRET) en dHDL diméricas.....	83
4.5.1. FRET entre fluoróforos idénticos (homo-FRET) o diferentes (hetero-FRET).....	84
4.5.2. El fenómeno de autoextinción de la fluorescencia.....	85
4.5.3. Estimación de la eficiencia de autoextinción en dHDL diméricas....	85
4.5.4. Influencia de la autoextinción y la distribución binomial en mediciones de homo-FRET.....	87
4.5.5. Influencia de la autoextinción y la distribución binomial en mediciones de hetero-FRET.....	87
4.5.6. Estimación de las distancias de Förster (R_0).....	88
4.5.7 Homotransferencia de energía en dHDL preparadas con mutantes marcadas con Alexa-488.....	91
4.5.8 Estimación de distancias intermoleculares en dHDL reconstituídas con proteínas marcadas con Alexa-350 mediante determinaciones de autoextinción y homo-FRET.....	94
4.5.9 Hetero-FRET con Alexa-350 como donador y Alexa-488 o Alexa-647 como aceptor.....	102
4.5.10. Determinaciones de tiempo de vida media de fluorescencia.....	105
4.6. Determinaciones de Resonancia Electrónica Paramagnética (EPR).....	108
4.7. Estimación de las distancias intermoleculares 107-107, 133-133 y 226-226 en los cristales de apoA-I Δ 1-43.....	110
4.8. Propiedades fisiológicas de las dHDL SC y CC. Remoción de colesterol de cultivos celulares.....	111
4.9. Lipidación espontánea de Apolipoproteína A-I: influencia del colesterol y fosfolípidos negativos.....	115
CAPITULO 5. DISCUSION y CONCLUSIONES.....	119
CAPITULO 6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	129
REFERENCIAS.....	131

1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y ATEROSCLEROSIS

1.1 Consideraciones Epidemiológicas

Actualmente la aterosclerosis es la enfermedad con mayor prevalencia en el mundo occidental, y en los últimos años la cifra de afectados en el resto del mundo ha aumentado drásticamente. Se estima que cada año mueren 17 millones de personas en el mundo a causa de enfermedades cardiovasculares entre los que se encuentran las embolias e infartos de miocardio [1].

La enfermedad coronaria es sin duda la que más mortalidad ocasiona, y ésta se debe principalmente a la aterosclerosis. Por esta razón, la aterosclerosis se ha convertido en un foco de atención importante en la investigación biomédica.

1.2 Aterosclerosis como principal causa de enfermedad cardiovascular

Se denominan enfermedades cardiovasculares a todo tipo de enfermedades relacionadas con el corazón o los vasos sanguíneos. Aunque las enfermedades cardiovasculares puedan contar con varias causas, la más común sin duda es la aterosclerosis. Esta causa es tan frecuente que se considera casi sinónimo de la enfermedad cardiovascular.

El término aterosclerosis proviene de los vocablos griegos athero(pasta) y skleros (duro, piedra). Consiste en una respuesta inflamatoria crónica en la pared de las arterias de mediano y gran calibre, debido al depósito de lipoproteínas cargadas de colesterol (2-4). Estos depósitos con el tiempo se convierten en auténticas lesiones y forman la placa ateromatosa. Esta placa al hacerse cada vez más grande va obstruyendo la luz de la arteria hasta que se ve afectado el flujo de sangre de tal forma que se produce un infarto en la zona por falta de riego. Además existe el riesgo de que la placa se desestabilice y se rompa produciendo así trombos que pueden obstruir vasos de menor tamaño.

1.3 Desarrollo de la lesión

El desarrollo de lesiones ateroscleróticas se debe a sutiles pero continuos daños al endotelio vascular. Esto puede deberse a un aumento de la presión sanguínea en zonas determinadas del árbol arterial como pueden ser las ramificaciones arteriales, sobretodo en personas con hipertensión o por estrés inflamatorio

implicando tanto células del sistema inmune como agentes pro-inflamatorios y lipoproteínas oxidadas (figura 1).

El endotelio es una capa de células que regula el intercambio de agua y pequeñas moléculas entre la sangre y los tejidos, el tono vascular, la coagulación y la fibrinólisis (5).

La lesión aterosclerótica comienza cuando el endotelio de una zona determinada se activa y se hace permeable, volviéndose disfuncional. Incluso algunas células pueden desaparecer dejando zonas desnudas de endotelio (6,7).

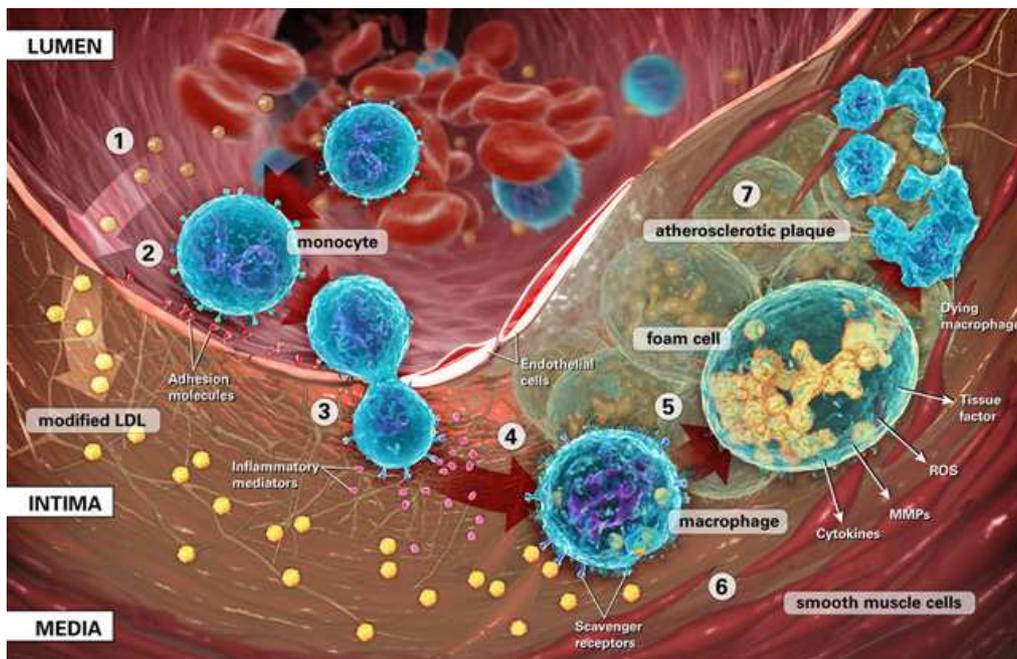


Figura 1. Evolución de la lesión aterosclerótica http://www.invivo.ca/illustration_and_print_formation_of_atherosclerosis.html

En el ambiente disfuncional del endotelio las moléculas plasmáticas penetran al espacio subendotelial, donde son modificadas (principalmente oxidadas) convirtiéndose en moléculas potencialmente pro-inflamatorias y quimioatrayentes. Este endotelio activado expresa moléculas de adhesión, principalmente la molécula de adhesión celular-1 (VCAM-1) las que contribuyen al reclutamiento de células plasmáticas circulantes hacia la lesión aterosclerótica (3,4).

Aunque la VCAM-1 actúa como molécula de adhesión al endotelio, no es suficiente para que las células plasmáticas puedan penetrar al espacio subendotelial. Para ello es necesaria la presencia de quimioquinas, siendo las más importantes las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-O) y las proteínas quimiotácticas de monocitos-1 (MCP-1) los que estimulan a las células

monocíticas de la sangre a penetrar el endotelio y allí convertirse en macrófagos capaces de fagocitar el colesterol oxidado a través de los receptores “scavenger”. Estos se transforman en células espumosas, las que finalmente mueren por sobrecarga debido a que los receptores scavenger no están regulados por el acumulo de colesterol intracelular. Además, los macrófagos poseen propiedades desestabilizadoras y trombogénicas por medio de la expresión de enzimas proteolíticas de degradación de la matriz (por ej. Metaloproteinasas de matriz) y factor tisular. Este acúmulo de células espumosas da lugar a estrías grasas siendo la primera manifestación evidente macroscópicamente de inicio de lesión aterosclerótica (3).

La lesión inicial de estría grasa suele cursar de forma asintomática y para que evolucione la lesión, a esta respuesta inmunoinflamatoria se le suma una respuesta fibroproliferativa mediada por células musculares lisas en la íntima.

Aunque inicialmente estas células tienen una función reparadora tras lesiones arteriales, una señal inmunoinflamatoria prolongada puede hacer que esta respuesta sea tan voluminosa que obstruya la luz de los vasos, comprometiendo el flujo sanguíneo y finalmente terminando con isquemia de la zona (8).

Sin embargo estas células musculares también tienen un efecto positivo, ya que la matriz extracelular rica en colágeno que producen confiere estabilidad a la placa, protegiéndola de posibles rupturas y consiguiente trombosis (9).

En las etapas avanzadas de la lesión se puede producir en algunas ocasiones calcificación de la placa. El calcio es el componente mas rígido de los circundantes de la placa aterosclerótica, y potencialmente podría actuar como un foco de ruptura de placa. Sin embargo, no se ha observado una ruptura excesiva en placas calcificadas e incluso podría asociarse a placas más estables (10).

En etapas avanzadas de aterosclerosis la angiogenesis es frecuente, y posiblemente caracterice a las placas de mayor riesgo (7,11). Estos nuevos vasos son frágiles y permeables, y al expresar moléculas de adhesión favorecen la extravasación de las proteínas plasmáticas además de los eritrocitos y células inflamatorias. Por lo tanto, la angiogenesis e inflamación frecuentemente coexisten y podría mediar la rápida progresión detrimetal de la placa (7,11, 12).

Las lesiones avanzadas se caracterizan por su inestabilidad, pudiendo producirse su ruptura dando lugar a trombos que, transportados por el flujo sanguíneo, pueden obstruir vasos de menor tamaño provocando episodios isquémicos agudos como infartos de miocardio o ictus aterotrombotico (7).

1.3.1 Clasificación de lesiones ateroscleróticas

Dependiendo de su aspecto histológico, las lesiones se clasifican en seis tipos (figura 2) (13-15):

Tipo I: son las primeras lesiones que se manifiestan en forma de depósitos lipídicos detectables de forma microscópica y química en la íntima. Además se producen los primeros infiltrados de leucocitos mononucleares.

Tipo II: Estas lesiones son conocidas como estrías grasas. Contienen capas adyacentes de macrófagos o células espumosas a diferencia de las lesiones tipo I donde solo aparecen como grupos aislados. También se aprecian células musculares lisas en la media e íntima y algunas presentan gotas de grasa intracelulares. Además se observan linfocitos T y mastocitos.

Tipo III: Conocida también como lesión intermedia, o preateroma. Presenta gránulos lipídicos extracelulares que rompen la integridad de las células musculares, produciendo un engrosamiento de la íntima.

Tipo IV: Estas lesiones son también conocidas como ateroma, y son caracterizados por un gran núcleo lipídico extracelular formado por la confluencia de los gránulos lipídicos generados en la lesión tipo III. El núcleo lipídico provoca el engrosamiento de la pared arterial, aunque no a expensas del lumen.

Tipo V: las lesiones tipo V se caracterizan por el desarrollo de una capa fibrosa sobre el núcleo lipídico generándose la llamada fibroateroma o lesión tipo Va. Si partes de la lesión están calcificadas se denominan lesiones tipo Vb. Aquellas lesiones que carecen de núcleo lipídico se denominan Vc. Estas lesiones se acompañan de un estrechamiento del lumen, principalmente provocado por el aumento del tejido fibroso extracelular, en especial por la mayor presencia de colágeno y células musculares lisas.

Tipo VI: se producen cuando a las lesiones tipo V se les suma la rotura de la superficie de la lesión (VIa), un hematoma o hemorragia (VIb) o el desarrollo de depósitos trombóticos (VIc). Son la mayor causa de morbi-mortalidad producida por aterosclerosis.

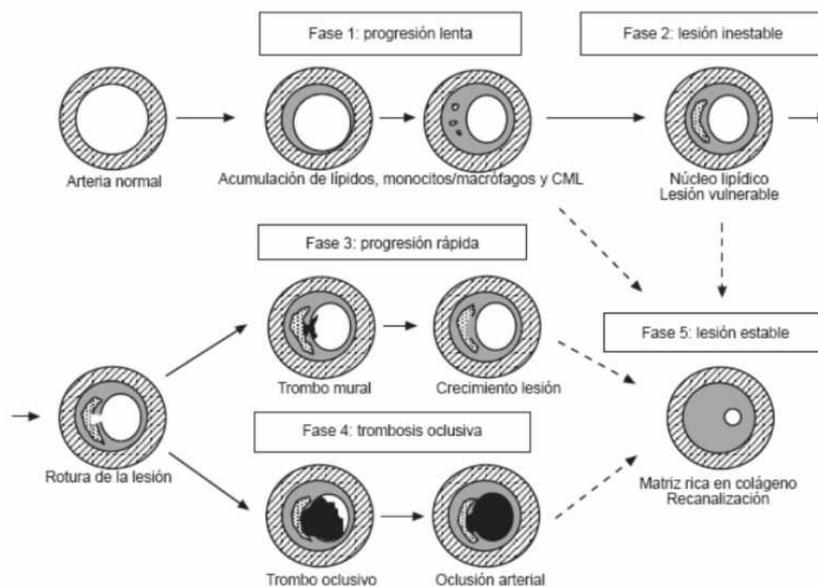


Figura. 2 Tipos de lesión aterosclerótica

1.4 Factores de riesgo

Los factores genéticos son uno de los principales factores de riesgo para padecer aterosclerosis, sin embargo en muchos casos no son suficientes para manifestar la enfermedad, sino que además debe estar presente alguno de los siguientes factores de riesgo:

1.4.1 Hipercolesterolemia

La importancia del colesterol como uno de los principales factores patogénicos en el desarrollo de la lesión aterosclerótica fue señalado por primera vez a mediados del siglo XIX por el patólogo Alemán Virchow (16). A la mitad del siglo XX, con el aumento en la incidencia de la patología derivada de enfermedad aterosclerótica, este paradigma fue ganando aceptación hasta llegar a ser considerado uno de los principales factores de riesgo asociados con la progresión de la aterosclerosis y la incidencia de enfermedad cardiovascular. Actualmente el aumento de colesterol en sangre debido al aumento en la concentración de colesterol en LDL (c-LDL) es aceptado como el principal factor de riesgo de enfermedad aterosclerótica (17-19) y aunque su efecto es reversible ya que si se reduce su nivel con fármacos o dieta, el riesgo de morbi-mortalidad desciende.

1.4.2 Hipertensión arterial

La prevalencia de hipertensión arterial (HTA), en población general española es de 35%, considerando como hipertenso a aquellos sujetos con presión arterial

sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) igual o mayor de 140 y 90 mm Hg respectivamente o en tratamiento farmacológico antihipertensivo.

1.4.3 Tabaquismo

El consumo de tabaco constituye uno de los principales riesgos para la salud cardiovascular y es la principal causa de morbi-mortalidad prematura y prevenible en el mundo desarrollado.

El hábito tabáquico se ha asociado con mayores concentraciones de colesterol total y menores de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), así como con hipertrigliceridemia posprandial (24), mayor agregación plaquetaria y actividad vasomotora (25). En los últimos estudios epidemiológicos se ha relacionado además con nuevos marcadores de riesgo emergentes tales como la proteína C reactiva, homocisteína y fibrinógeno (26).

1.4.4 Diabetes mellitus

El diagnóstico de diabetes mellitus (DM) se establece cuando los valores de glucosa en sangre en ayunas son superiores a 125 mg/dl en al menos dos determinaciones realizadas en dos días diferentes o bien cuando alcanzan los 200 mg/ dl en cualquier determinación o a las dos horas de realizar una sobrecarga oral de 75 mg de glucosa (31). Los sujetos de DM no controlada presentan una evolución más acelerada de la enfermedad aterosclerótica debido a diferentes mecanismos como hiperglucemia, perfil cardiovascular y la mortalidad en sujetos con DM es equivalente a la de aquellos sujetos no diabéticos que han sufrido un episodio isquémico vascular (19, 33).

1.4.5 Obesidad

La obesidad es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular. Se ha descrito un incremento continuo y gradual del riesgo relativo de mortalidad con el aumento del índice de masa corporal debido a su asociación con el síndrome metabólico (SM) (42, 43).

1.4.6 Hormonas sexuales

Se ha demostrado que las hormonas masculinas tienen propiedades aterogénicas, mientras que los estrógenos protegen de la aterosclerosis, por eso las mujeres se afectan después de la menopausia (51, 52). Este factor junto con la edad no depende del estilo de vida.

Factores protectores

Contrarrestando el efecto de estos factores de riesgo y otros que no hemos revisado, existen también factores protectores. El más importante de estos es el nivel de c-HDL. La importancia de las HDL como factor protector radica en el hecho que estas lipoproteínas retiran colesterol de los tejidos y los transporta al hígado (53).

Se han establecido unos criterios para determinar el riesgo de enfermedad coronaria de cada persona en función de los niveles de HDL. Desde 1950 se ha observado una correlación inversa de HDL con enfermedad cardiovascular pero no fue hasta 1970, cuando esta idea se aceptó y se establecieron los siguientes límites según el programa nacional de Educación Sobre el Colesterol (NCEP) (54, 55).

[c-HDL] < 35 mg/dL es un factor de riesgo positivo para enfermedad coronaria.

[c-HDL] > 60 mg/ dL es un factor de riesgo negativo para la enfermedad coronaria

Para profundizar sobre estos factores de riesgos vamos a analizar el metabolismo lipídico así como la estructura y función de las proteínas implicadas.

1.5 Definición y características de las lipoproteínas plasmáticas

Los lípidos exógenos y endógenos deben ser transportadas a los diferentes tejidos u órganos, ya sea para almacenarlos, utilizarlos como fuente de energía o convertirlos en productos especializados (ácidos biliares, hormonas esteroides, etc.), pero debido a que son insolubles en agua su transporte por el plasma resulta dificultoso ya que éste es un medio acuoso.

Las lipoproteínas son macromoléculas cuya función es empaquetar los lípidos insolubles en el medio acuoso del plasma y transportarlos desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos y, desde éstos, devolver el colesterol al hígado para su eliminación del organismo en forma de ácidos biliares fundamentalmente.

Las lipoproteínas plasmáticas constituyen un sistema polidisperso y heterogéneo de partículas de morfología casi esférica, que tienen un núcleo hidrófobo formado por lípidos no polares, es decir, colesterol esterificado y triglicéridos (TAG), y por una capa superficial hidrófila que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos (FL) y unas proteínas específicas denominadas apolipoproteínas (Apo). Las Apo no solamente cumplen un papel estructural en las partículas lipoproteicas, ya que intervienen en el metabolismo de las mismas, en el que ejercen distintas funciones, actuando como activadoras e inhibidoras de enzimas e interaccionan con receptores celulares específicos. Actualmente son conocidas las Apo: A, B, C, D, E, F y G. Algunas de estas presentan isoformas (que se indican con números romanos) y se diferencian por su contenido glucídico. También podemos

mencionar que la ApoB48 presente en los quilomicrones (Q) que se sintetiza en el intestino, representa el 48 % del ARN mensajero de la Apo-B presente en las VLDL, IDL y LDL conocida como Apo-B100. Esto se produce por un mecanismo postranscripcional de corte y empalme.

1.6 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEINAS

Las partículas lipoproteicas se diferencian entre sí por la distinta proporción de colesterol, TAG y FL que contienen, así como por las distintas apoproteínas integradas en su estructura. La nomenclatura de las diferentes lipoproteínas presentes en el plasma humano se basa en el hecho de que estas están encuadradas dentro de rangos de densidades. Cada clase posee una determinada movilidad electroforética, lo que ha permitido clasificarlas de acuerdo a su posición en el soporte. Aunque el espectro de las lipoproteínas plasmáticas es amplio, en la actualidad, las lipoproteínas plasmáticas se clasifican en:

- Quilomicrones (Q): que sólo se encuentran en el plasma normal después de una comida grasa.
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés very low density lipoproteins).
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, intermediate density lipoproteins).
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoproteins).
- Lipoproteína (a) o Lp(a)
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoproteins).

Características físicas de las Lipoproteínas plasmáticas			
Lipoproteína	Movilidad electroforética	Diámetro (nm)	Densidad (gr/ml)
Q	Origen	75-1.200	< 0,93
VLDL	Pre-beta	30-80	0,93-1,006
IDL	Pre-beta	25-35	1,006-1,019
LDL	Beta	18-25	1,019-1,063
Lp (a)	Pre-beta	26-30	1,040-1,130
HDL	Alfa	5-12	1,063-1,210

Tabla 1. Características físicas de las lipoproteínas

1.7 Síntesis de HDL

Son sintetizadas y secretadas por el hígado y en una menor proporción por el intestino. La fracción de HDL representa un grupo heterogéneo de partículas, constituidas por las HDL2 que son de mayor tamaño y HDL3 que son más pequeñas. También se conoce otra subfracción: la HDL1 que por su tamaño y densidad es similar a la subfracción HDL2 difiriendo con esta solo en la afinidad por los receptores de la LDL, debido a que las partículas de HDL carecen de Apo-E.

Estas lipoproteínas son secretadas en forma de HDL nacientes (dHDL) que son partículas discoidales compuestas por una bicapa de fosfolípidos y colesterol libre rodeada de Apo-A (en especial de AI), Apo-E y Apo-C. Cabe aclarar que las dHDL de origen intestinal no contienen Apo-C y Apo-E. La Apo-C es sintetizada en el hígado y transferida a las HDL intestinales cuando éstas entran al plasma. Una vez en el plasma, sobre las dHDL (55) actúa la LCAT. Esta enzima para poder actuar, se incorpora a una fracción de las HDL y en presencia de Apo-AI como cofactor, esterifica el colesterol libre de la superficie de la lipoproteína y el proveniente de las células de los tejidos. Este colesterol esterificado se ubica en el centro de la partícula convirtiendo su forma discoidal o naciente en esférica o madura representado por las HDL2 (más grandes, menos densas y ricas en colesterol esterificado).

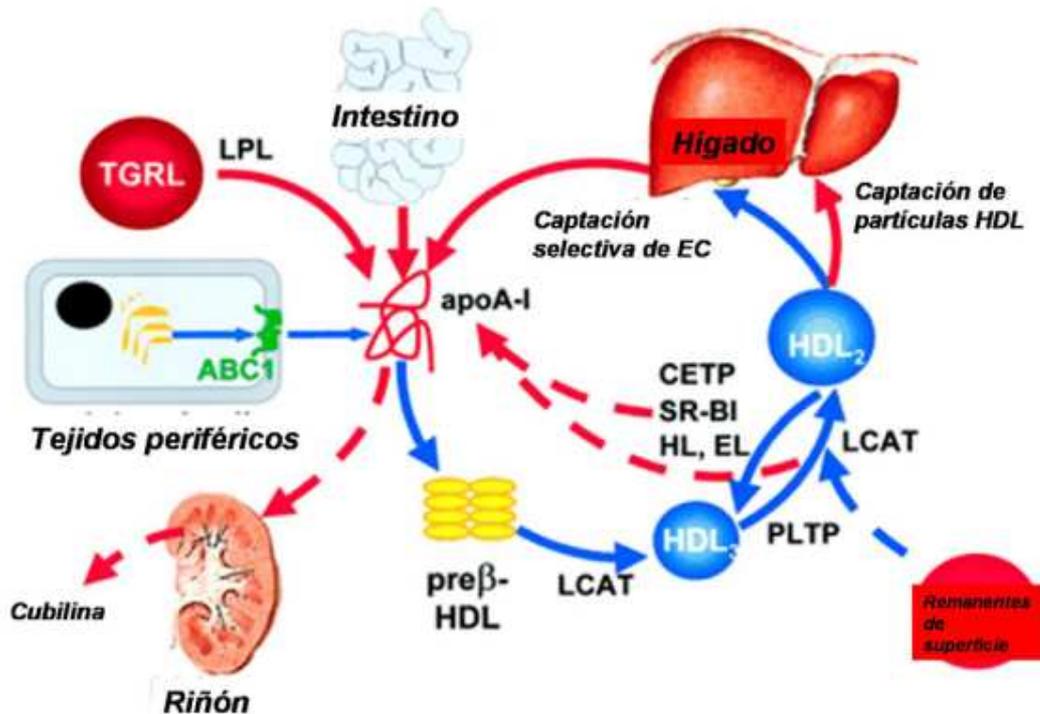


Figura 3 Vías implicadas en la generación e interconversión de las HDL

1.8 Rol de apoAI y HDL en el TRC. Generación de HDL discoidales por células

La interacción de apoAI con células periféricas resulta en la generación de HDL nacientes (dHDL) en un proceso mediado por el ATP-binding cassette A1 (ABCA1), una proteína que trasloca fosfolípidos desde la hemicapa interna hacia la externa de la membrana celular (57). Estas dHDL pueden captar colesterol desde dominios de membrana ricos en este compuesto como las caveolas (58) antes de pasar a la circulación donde son sustrato de la (LCAT). La formación de ésteres de colesterol (EC) genera un núcleo hidrofóbico y la forma esférica de las HDL mayoritarias en circulación. Los EC pueden ser captados por el hígado directamente de las HDL a través del "scavenger receptor BI" (SR-BI) o mediante el previo intercambio con LDL. Estas reacciones de cesión o intercambio de lípidos, además del intercambio con otras proteínas como apolipoproteína A-II, regeneran apoAI libre o pobre en lípidos que reinicia el ciclo de remoción de colesterol en los tejidos periféricos (3). ApoAI también desencadena en células la movilización hacia la membrana plasmática de depósitos endógenos de colesterol por mecanismos aún no muy bien conocidos (59).

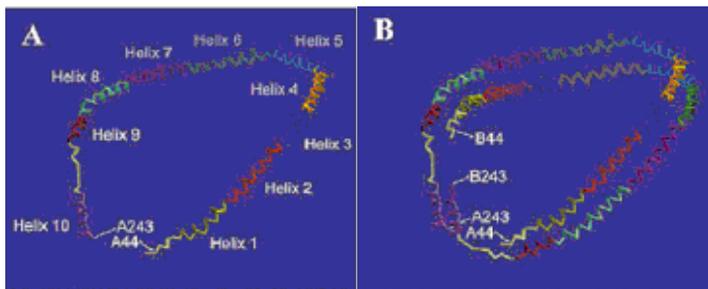
La incubación de apoAI exógena con cultivos celulares resulta en la formación de una serie de dHDL de diferente tamaño en un proceso dependiente de ABCA1 (60). Estas dHDL presentan migración electroforética α lo que se atribuye a la presencia de fosfolípidos negativos y existiendo también una correlación entre el tamaño y el contenido de colesterol de estas partículas. En células productoras de apoAI, la misma es secretada en un proceso que parece independiente del ABCA1 (61) en la forma de pequeños complejos que también se suponen discoidales, pero que presentan migración electroforética β , aparentemente por contener una baja proporción de fosfolípidos negativos. Así, las dHDL son intermediarios de gran importancia en el metabolismo de las HDL. El estudio de su estructura y función, sin embargo, se ve limitado por su presencia minoritaria y dificultad de aislamiento.

1.9 Propiedades estructurales de apoAI. Flexibilidad y adaptabilidad conformacional.

La Apo es una proteína de 243 aminoácidos, recientemente se ha encontrado su estructura cristalina (67) en la cual se muestra que consiste de dos dominios formados por α -hélices anfipáticas: un ramillete de cuatro hélices formado por las $\frac{3}{4}$ partes de la secuencia hacia el extremo N, y un ramillete de dos hélices en el extremo C (figura 4, arriba). Muchas evidencias indican que estos ramilletes se abren para permitir la interacción de las caras hidrofóbicas de las hélices con lípidos. La región del extremo N juega un rol clave en la estabilización del estado

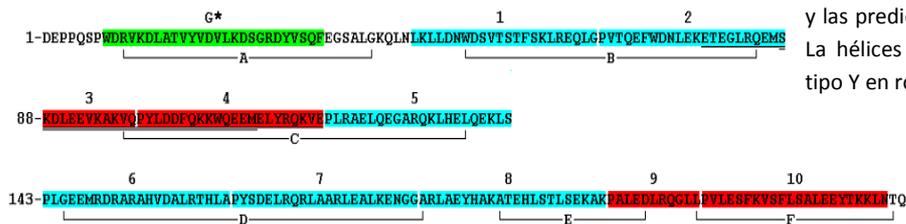
libre de lípidos, ya que su eliminación hace que la proteína cristalice en una conformación totalmente diferente (figura 4, arriba): un tetrámero en forma de herradura en el que cada monómero está extendido y altamente helicoidal. Esta estructura presenta muchas características de la apoAI unida a lípidos, como el contenido de hélice, por lo que se supone que sería más representativa de éste último estado (67).

Figura 4.



Arriba: Estructura cristalina de apoAI Δ 1-43. De referencia 69. A) Monómero aislado indicando las 10 hélices que se predicen de la secuencia. B) Dos monómeros interactúan entre sí de manera antiparalela. A su vez, dos dímeros interactúan entre sí para formar un tetrámero, la estructura básica del cristal.

Abajo: Correspondencia entre las hélices encontradas en la estructura cristalina (A a F) y las predichas de la secuencia (G* y 1 a 10). La hélices tipo A se indican en celeste, las tipo Y en rojo y la tipo G* en verde



Esta flexibilidad configuracional es una característica de todas las apolipoproteínas intercambiables (68) y permitiría que éstas puedan adaptarse a los diferentes estados en que se encuentran durante su ciclo funcional: libres, unidas a membranas o a una gran variedad de complejos lipoproteicos de diferente morfología (discoidales o esféricos), tamaño y composición.

1.9.1 Tipos de α -hélices anfipáticas en apoAI.

La estructura cristalina (69) de un fragmento de apoAI sin los primeros 43 residuos (apoAI Δ 1-43) es un tetrámero en forma de herradura en el que cada monómero está extendido y altamente helicoidal (fig 4). Como presenta muchas características de la apoAI en dHDL, se la supone representativa de este estado. En el estado libre, apoAI formaría un ramillete de hélices anfipáticas laxo y flexible (69), que se abre para permitir la interacción con lípidos de las caras hidrofóbicas de las hélices. Se distinguen 3 tipos de α -hélices (70). Hay 6 hélices de 22 residuos típicas de las apolipoproteínas intercambiables (hélices A) que tienen un agrupamiento de cargas positivas en la interfase hidrofílica/hidrofóbica y de cargas negativas en el centro de la cara hidrofílica. Otros dos pares de hélices (69-70-71) son denominadas tipo Y por tener 3 grupos de cargas positivas que asemejan a la

letra “Y”, con los residuos hidrofóbicos entre los brazos y residuos negativos entre los brazos y la base de la “Y”. Cada par tiene una repetición de 11 residuos seguida por una de 22 residuos. En el extremo N hay una hélice G*, con arreglo al azar de los residuos polares similar a las de proteínas globulares.

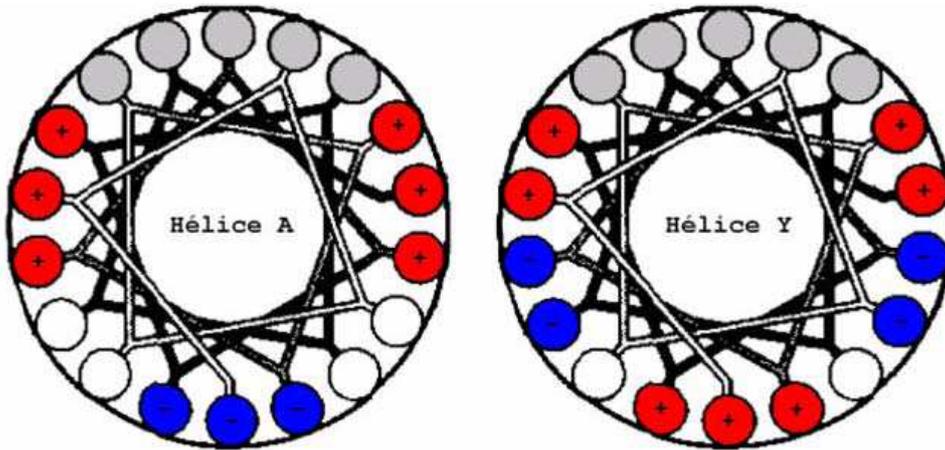


Figura 5. Distribución de residuos cargados en las hélices alfa tipo A y tipo Y

Secuencia de aminoácidos y tipos de α -hélices anfipáticas en la apolipoproteína A-I humana

```

001  ASP GLU PRO PRO GLN SER PRO TRP-ASP-ARG - VAL-LYS-ASP-LEU-ALA-THR-VAL-TYR-VAL-ASP
021  VAL-LEU-LYS-ASP-SER-GLY-ARG-ASP-TYR-VAL - SER-GLN-PHE GLU GLY SER ALA LEU GLY LYS
041  GLN LEU ASN LEU-LYS-LEU-LEU-ASP-ASN-TRP - ASP-SER-VAL-THR-SER-THR-PHE-SER-LYS-LEU-
061  -ARG-GLU-GLN-LEU-GLY PRO VAL-THR-GLN-GLU - PHE-TRP-ASP-ASN-LEU-GLU-LYS-GLU-THR-GLU-
081  -GLY-LEU-ARG-GLN-GLU-MET-SER LYS-ASP-LEU - GLU-GLU-VAL-LYS-ALA-LYS-VAL-GLN PRO TYR-
101  -LEU-ASP-ASP-PHE-GLN-LYS-LYS-TRP-GLN-GLU - GLU-MET-GLU-LEU-TYR-ARG-GLN-LYS-VAL-GLU
121  PRO LEU-ARG-ALA-GLU-LEU-GLN-GLU-GLY-ALA - ARG-GLN-LYS-LEU-HIS-GLU-LEU-GLN-GLU-LYS-
141  -LEU-SER PRO LEU-GLY-GLU-GLU-MET ARG-ASP - ARG-ALA-ARG-ALA-HIS-VAL-ASP-ALA-LEU-ARG-
161  -THR-HIS-LEU-ALA PRO TYR-SER-ASP-GLU-LEU - ARG-GLN-ARG-LEU-ALA-ALA-ARG-LEU-GLU-ALA-
181  -LEU-LYS-GLU-ASN GLY-GLY ALA-ARG-LEU-ALA - GLU-TYR-HIS-ALA-LYS-ALA-THR-GLU-HIS-LEU-
201  -SER-THR-LEU-SER-GLU-LYS-ALA-LYS PRO ALA - LEU-GLU-ASP-LEU-ARG-GLN-GLY-LEU-LEU PRO
221  VAL-LEU-GLU-SER-PHE-LYS-VAL-SER-PHE-LEU - SER-ALA-LEU-GLU-GLU-TYR-THR-LYS-LYS-LEU-
241  -ASN THR GLN
  
```

Hélice G*

Hélices A

Hélices Y

Fig 6. Secuencia aminoacídica de la apo madura (los aminoácidos nombrados según el código de 3 letras).

1.10 Interacción de apoA1 con superficies lipídicas: HDL esféricas y estado unido a membranas

1.10.1 La Bicapa Lipídica

La estructura de la membrana celular es en forma de bicapa lipídica. Esta bicapa lipídica puede ser considerada como una matriz donde se incorporan otras muchas moléculas que forman parte también de las diferentes membranas celulares. La bicapa lipídica es una estructura fluida y dinámica. Este dinamismo de la bicapa se conoce como modelo de mosaico fluido, en el que se encuentran implicadas activamente todas las moléculas que forman parte de la bicapa, ya sean fosfolípidos, glucolípidos, esteroides y proteínas, entre otros.

El modelo del mosaico fluido, postulado en 1972 por Singer y Nicholson, establece que los fosfolípidos de las membranas se encuentran ordenados en forma de bicapa fluida. La fluidez de esta bicapa permite el movimiento individual de las diferentes moléculas que forman parte de la misma. Este dinamismo molecular confiere a la membrana una gran elasticidad así como propiedades eléctricas y una relativa impermeabilidad frente a moléculas muy polares.

1.10.2 Fluidez de la bicapa

Los lípidos de las membranas pueden encontrarse, en función de la temperatura, en dos estados o fases diferentes: fase de gel (las cadenas hidrocarbonadas del lípido están rígidas), y fase de cristal-líquido o fluida (las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos están móviles). La temperatura a la cual se produce el cambio de estado de gel a cristal-líquido se denomina temperatura de transición (T_m) (figura 6). A valores de temperatura inferiores a la T_m , el lípido se encuentra en fase gel y a valores superiores, se encuentra en fase de cristal-líquido (Keough y Davis, 1979; Bergethon, 1998).

En el caso de fosfolípidos puros, la T_m está bien definida y la transición se produce de forma altamente cooperativa. En los sistemas biológicos se encuentran mezclas lipídicas complejas, formadas por más de un tipo de lípido, la transición se produce en un intervalo de temperaturas y suele existir una baja cooperatividad (Bergethon, 1998).

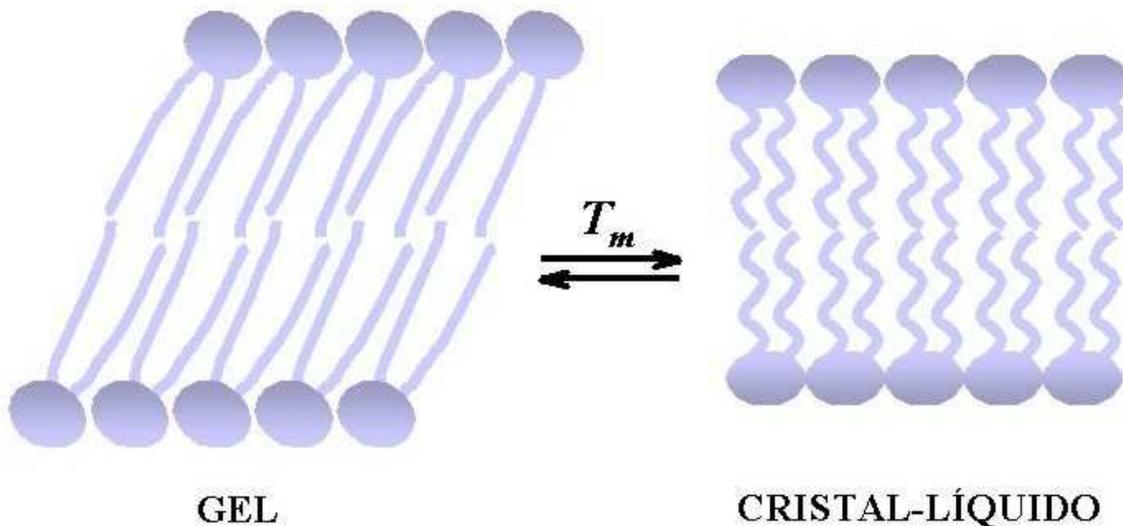


Figura 7, Transición de estado en una bicapa lipídica entre la fase de gel y la de cristal-líquido

Es generalmente aceptado que las dHDL consisten de una bicapa lipídica en forma de disco, rodeada en el borde por las hélices anfipáticas de apoA1. Aunque la organización de las hélices en el borde del disco ha sido largamente discutida, hoy existe un acuerdo general en que la mayoría de las hélices se disponen con su eje mayor perpendicular a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (70).

La gran mayoría de los estudios estructurales sobre las dHDL han sido realizados en discos de 2 moléculas de apoA1 obtenidos mediante diálisis de micelas mixtas con un detergente como colato. Diferentes evidencias indican que en este caso se obtiene una mezcla de dHDL con al menos dos configuraciones. Usando estimaciones de distancias intermoleculares por transferencia de energía de resonancia (FRET) con mutantes de cisteína marcadas con un grupo fluorescente, Tricerri et al (71) concluyeron que las moléculas de apoA1 se disponen en forma de "cinturón" con dos configuraciones: cabeza-cabeza y cabeza-cola (ver figura 2). Mediante el mapeo de los residuos de lisina cercanos entre sí usando un agente entrecruzante (crosslinker) y posterior tripsinólisis y espectrometría de masa, Silva et al (72) también detectaron dos configuraciones coexistentes, aunque soportando el modelo del "doble cinturón" con las hélices de apoA1 totalmente extendidas y antiparalelas entre sí (figura 2). En una de estas configuraciones (denominada 5/5), quedan enfrentadas las hélices 5 de cada molécula de apoA1. En la otra (llamada 5/2), la hélice 5 de una molécula queda enfrentada a la hélice 2 de la segunda molécula de apoA1.

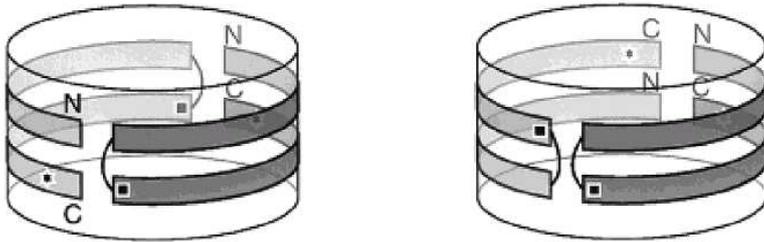


Figura 8. Modelo de la "hebilla" en la configuración cabeza-cola (izquierda) y en la configuración cabeza-cabeza (derecha). De referencia 11.

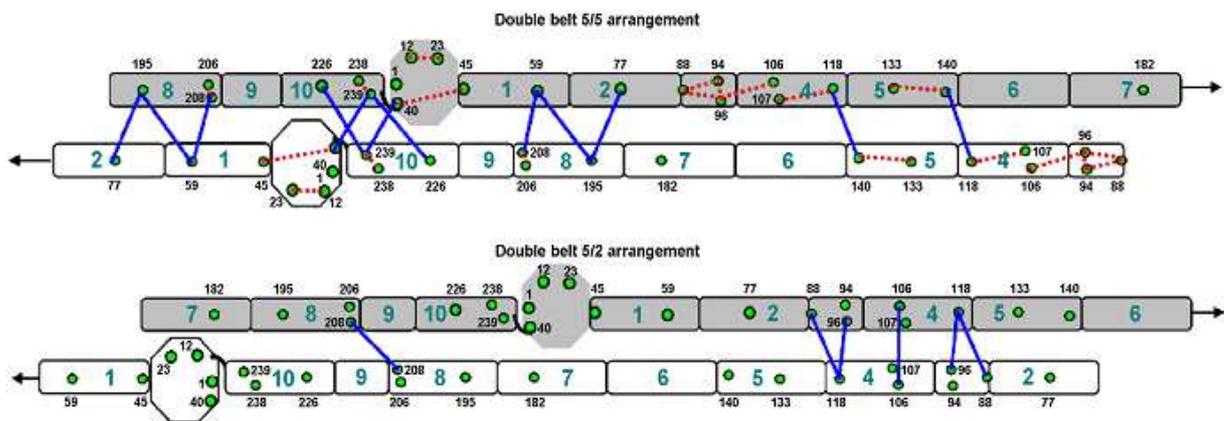


Figura 9. Modelo del "doble cinturón" en la configuración 5/5 (arriba) y en la configuración 5/2 (abajo), indicando los entrecruzamientos encontrados entre residuos de lisina cercanos entre sí (72).

Las dHDL también pueden ser obtenidas por la reacción directa de apoA1 con vesículas fosfolipídicas en la temperatura de transición de fase gel/líquido-cristalino (T_t) como por ejemplo de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) a 24°C. Estas dHDL han sido menos estudiadas, pero evidencias recientes de este laboratorio (Prieto ED, Garda HA. Biochemistry 2011) indican que la configuración de apoA1 en estas partículas es diferente en comparación con las preparadas por diálisis con colato. El patrón de péptidos obtenido por RP-HPLC o MALDI-TOF del producto de tripsinólisis luego del entrecruzamiento covalente de lisinas con el agente DSP, difiere entre ambas preparaciones. Además, usando mutantes de único residuo triptofano (en las posiciones 104 o 108 de la hélice 4), se encontró una mayor eficiencia de homotransferencia de energía (homo-FRET) Trp-Trp en las dHDL preparadas por la reacción directa. Esto indica una menor distancia promedio entre las hélices 4 de cada molécula de apoA1 en estas dHDL, y sugiere que en este caso existiría una configuración única con las hélices 4 enfrentadas

entre sí, lo que podría corresponder a la configuración cabeza-cabeza del modelo de la "hebilla" de Triccerri et al., o al "doble cinturón" 5/2 propuesto por Silva et al.

La generación de dHDL por la reacción directa requiere de la unión previa de apoAI a la membrana de las vesículas. Como se observó previamente (73), la unión de apoAI a vesículas lipídicas va acompañada de dimerización. Así, es muy probable que esta dimerización imponga una restricción y determine la configuración única de las dHDL generadas de esta manera.

Existen estudios sobre la configuración de las dHDL generadas por la interacción de apoAI con células. Se supone que la actividad traslocadora de fosfolípidos de ABCA1 generaría el entorno lipídico adecuado para la unión de apoAI a la membrana y su consecuente lipidación. Si como ocurre con membranas artificiales, la unión de apoAI a la membrana celular fuera también acompañada de dimerización, las dHDL generadas también podrían tener una configuración única.

ABCA1 parece tener cierta especificidad para traslocar fosfolípidos negativos (57) y las dHDL generadas por la acción de este transportador contienen este tipo de lípidos (74). Interesantemente, la reacción espontánea de apoAI con vesículas de fosfolípidos negativos para generar complejos lipoproteicos es eficiente aún a temperaturas alejadas de Tt (75). La estructura de estos complejos de apoAI con fosfolípidos negativos, sin embargo, no ha sido estudiada hasta el momento.

1.11 El par central de hélices Y. Independencia funcional y estructural

Mediante el uso de reactivos fotoactivables, se ha detectado en este laboratorio que la región de apoAI comprendida entre los residuos 87 y 112 tiene relativamente poco contacto con lípidos en las dHDL, pero es la única que se inserta profundamente en membranas fosfolipídicas (76). Estudios con un péptido sintético abarcando esta región (AI 77-120) indicaron que el mismo presenta varias propiedades de la proteína completa (73), como: a) insertarse preferencialmente en membranas ricas en colesterol, b) catalizar la desorción de colesterol de membranas y su intercambio entre vesículas y c) promover la salida de colesterol de cultivos celulares. Así, este dominio sería responsable de anclar a las dHDL a membranas ricas en colesterol favoreciendo la captación de este compuesto (77, 78).

Algunos programas como PSSM (79) predicen analogía estructural entre esta región de apoAI y ectatomine, una toxina cuya estructura en solución acuosa es conocida por NMR. Esta es un dímero de dos subunidades similares con dos hélices anfipáticas, dando una estructura total de un ramillete de 4 hélices (70). Estas hélices sufren un re-arreglo conformacional para insertarse en membranas generando un canal iónico (71).

Al 77-120 presenta un considerable contenido de hélices. Su unión a membranas ocurre sin grandes cambios en la estructura secundaria, pero va acompañada de oligomerización (73). Esto y la similitud con ectotamine, nos llevó a proponer que el dominio de inserción activo de apoAI podría ser un ramillete de hélices intermolecular conformado por las dos regiones centrales. Para que esta estructura pueda formarse en las dHDL, se requiere que las regiones centrales de cada molécula de apoAI queden cercanas entre sí, como parece ocurrir especialmente en las dHDL que resultan de la reacción directa de apoAI con vesículas de DMPC a 24° C.

El aumento de tamaño y contenido de colesterol de las dHDL afecta a la conformación de esta región como se detectó por la reactividad con anticuerpos monoclonales (77), y disminuye tanto la afinidad como la capacidad de intercambiar colesterol con membranas (78), por lo que sería el determinante de la liberación de dHDL ricas en colesterol a la circulación. Así, es posible que los cambios conformacionales en esta región inducidos por el incremento en tamaño y por la presencia de colesterol puedan dificultar la formación del ramillete intermolecular y el dominio de inserción activo.

Más recientemente (González et al, Biochem Biophys 2008), también observaron que Al 77-120 es tan activo como apoAI en promover en células la movilización de depósitos endógenos de colesterol hacia la membrana plasmática. Estudios con mutantes indican que la capacidad de inducir estas respuestas celulares no depende de una secuencia específica en la región central mientras se conserve la distribución de cargas tipo Y, pero es seriamente afectada por una delección en la hélice 4 que cambia el registro y orientación de la hélice anfipática. Las dHDL pequeñas y libres de colesterol presentan la misma actividad de apoAI libre para inducir estas respuestas celulares, pero la misma se pierde en las dHDL grandes y ricas en colesterol.

1.12 Distintas conformaciones de las HDL

Se mencionó previamente que las partículas lipoproteicas poseen diferentes conformaciones, que son fundamentales para realizar distintos aspectos fisiológicos. En las HDL estas conformaciones van desde pequeñas partículas discoidales hasta grandes y esféricas, y por lo tanto se requiere que la apoA-I sufra grandes cambios conformacionales a fin de adaptarse a los distintos entornos. De acuerdo al modo de separarlas, ya sea por electroforesis o gradientes de densidad, existen diversas clasificaciones, (Anderson et al., 1977), (Barrans et al., 1996)

Básicamente existen tres tipos de estructuras de HDL en las que se encuentra la apoA-I: 1) grandes partículas esféricas constituidas tanto por lípidos neutros como por lípidos polares, 2) partículas discoidales constituidas principalmente por lípidos polares y 3) partículas pequeñas pobres en lípidos. Si se realiza una separación electrofóretica bidimensional del plasma humano, la mayor parte de la apoA-I se encuentra asociada a partículas esféricas de movilidad electroforética α (9-12 nm de diámetro), y otra pequeña fracción a lipoproteínas de movilidad pre- β (Castro and Fielding, 1988). Tanto en las α como en las pre- β , su densidad y tamaño son heterogéneos.

1.12.1 HDL- esféricas

La mayor proporción de estas HDL contienen apoA-I y apoA-II, siendo esta última la segunda apolipoproteína más abundante en las HDL. La proporción de HDL esféricas que solamente contienen apoA-I (11-45%) se denomina LpAI (Fielding and Fielding, 1981), pudiendo estabilizar un núcleo hidrofóbico de ésteres de colesterol (Scanu and Tardieu, 1971) gracias a la interacción entre los lípidos y las caras hidrofóbicas de las hélices de la apoA-I.

La conformación de la Apo A-I en estas partículas es muy diferente a la que posee cuando se encuentra formando complejos discoidales, los primeros indicios al respecto fueron realizados con anticuerpos monoclonales que identifican diferentes regiones o epitopes (Marcel et al., 1991), lo que indicaría grandes cambios conformacionales, y por lo tanto gran flexibilidad entre las diferentes regiones de la apoA-I.

Las partículas esféricas contienen igual masa de lípidos que de proteínas, (en promedio entre las HDL2 y HDL3) y se cree que la apoA-I formaría una monocapa externa rodeando a un núcleo hidrofóbico con la cara hidrofóbica de las hélices anfipáticas (ver mas abajo) expuesta hacia los lípidos del core hidrofóbico (el esquema se muestra en la figura.1-6). El colesterol libre puede particionarse entre el núcleo y la superficie, con una mayor fracción en esta última (Lund-Katz et al., 1982), la relación que existe en estas partículas de fosfolípidos/colesterol es de 5/1 (similar a la de las membranas). Todas estas relaciones son dinámicas en el sentido que tanto lípidos como proteínas se pueden intercambiar con otras lipoproteínas en el plasma.

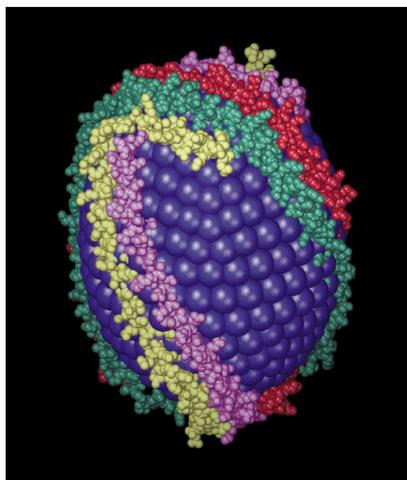


Figura 10 Modelo de α - HDL esférica propuesto por Borran (Borhani et al., 1997)

1.12.2 Pre- β -1 HDL (Fielding and Fielding, 1995)

Las pre- β -1 HDL son partículas pequeñas conteniendo solamente apoA-I y pequeña cantidad de fosfolípidos, llamándoselas “lipid Poor”, para diferenciarlas de otras pre- β discoidales más ricas en lípidos, y de las α -HDL; comprenden el 5-8 % de las HDL en plasma, aunque son mas abundantes en linfa y en líquido intersticial. Tienen un peso molecular de aproximadamente 60-70 kD, con un diámetro calculado de 5 a 6 nm.

Se ha postulado por modelos sintéticos que la conformación de estas partículas es de pequeños discos o de forma elipsoidal (Luna-Chavez et al., 1994). Con anticuerpos monoclonales se ha encontrado que en las diferentes partículas existen diferentes exposiciones de epitopes, en las pre- β -1 HDL existe un epitope continuo entre los residuos 137 y 144 de la apoA-I salvaje, siendo que en presencia de estos anticuerpos las pre- β -1 HDL no pueden remover eficientemente colesterol, en estas partículas se encontró también una susceptibilidad a la proteólisis con trombina cerca del residuo 100 (Kunitake et al., 1990); se predicen en estas regiones giros de tipo β . Otras regiones de la apoA-I generan epitopes de reconocimiento por anticuerpos monoclonales en estas partículas que incluyen el extremo N-terminal y los residuos comprendidos entre 167-174, pero no existen reconocimiento de la región 93-99 como sí ocurre en otro tipo de partículas discoidales (Marcel et al., 1991),(Marcel and Kiss, 2003).

1.12.3 Pre- β -2- HDL Discoidales

Este tipo de partículas discoidales es una pequeña fracción de las dHDL, la proporción que existe es de alrededor de 2-3 % de las HDL plasmáticas, estando en una proporción mayor en líquido intersticial (Barrans et al., 1996). Esta región es más sensible a proteólisis por trombina (Kunitake et al., 1990). Estas presentan heterogeneidad en tamaño, densidad y composición lipídica, pudiendo contener dos o tres moléculas de apoA-I por disco como único componente proteico. No se sabe cuál es la conformación que posee la apoA-I en estos complejos *in-vivo*, pero se han postulados diferentes modelos, en complejos obtenidos artificialmente.

Son ricas en fosfatidilcolina y contienen baja proporción de colesterol y esfingomielina. Las pre β -1 y las pre β -2 difieren básicamente en su contenido lipídico, en especial, fosfatidilcolina y no se detectan ésteres de colesterol (Barrans et al., 1996).

1.13 Aspectos fisiopatológicos en el transporte de colesterol

Una de las mejores evidencias de la relevancia en el transporte de lípidos mediado por apolipoproteínas surge a partir de estudios con fibroblastos de sujetos con una deficiencia genética llamada enfermedad de Tangier, la cual se caracteriza por una ausencia casi completa de HDL en plasma y de apoA-I, y por acumulación de ésteres de colesterol en diferentes tejidos por macrófagos tisulares. La estructura de la apoA-I como de sus productos lipoproteicos son normales, y estudios con cultivos celulares de pacientes con esta enfermedad y a la cual se le agrega apoA-I purificada, demostraron una reducida habilidad para remover colesterol y fosfolípidos de dichas células, lo que implica una severa deficiencia en la formación de HDL y por lo tanto del transporte reverso de colesterol. Esta enfermedad es autosómica recesiva en donde está modificado el gen que codifica para la proteína integral de membrana mencionada más arriba, el transportador ABCA1. Este tipo de transportador interacciona con la apoA-I o con sus partículas pobres en lípidos, las pre β 1-HDL, en las inmediaciones de la membrana en donde se cargarían de fosfolípidos negativos y/o colesterol. Partículas lipoproteicas con apoA-I de sujetos normales tampoco son capaces de remover lípidos de estas células, sugiriendo que existe un deficiente mecanismo de interacción entre las partículas y el ABCA1. También en esta enfermedad existe una deficiente remoción de colesterol mediado por las otras apolipoproteínas como la apoA-II, E y CIII (Remaley and Hoeg, 1995). El transporte reverso de colesterol puede ocurrir además en parte por mecanismos independientes de ABCA1 como ser una difusión pasiva de colesterol desde la superficie celular a las HDL, y este mecanismo no estaría afectado en esta patología.

El estudio de esta enfermedad aportó datos sobre el metabolismo de lípidos desde los tejidos a todo el cuerpo y ayudó a la interpretación de bases moleculares del mismo, por ejemplo, el hecho que la apoA-I capte deficientemente colesterol y fosfolípidos lleva a un rápido aclaramiento de apoA-I del plasma y por lo tanto a un déficit de HDL esféricas (Fredrickson, 1964),(Assmann et al., 1993), lo que implica que la remoción de lípidos por apolipoproteínas es un requerimiento absoluto para generar incluso bajos niveles de HDL. La ausencia de HDL a su vez tiene implicancia sobre los niveles de otras lipoproteínas, como ser las LDL, que en estos individuos se encuentra a un nivel de 40% del normal. Los estudios *in vitro* en cultivos celulares demostraron que las apolipoproteínas libres o pobres en lípidos son las precursoras de este proceso, no requiriéndose ninguna en particular, y solamente pequeñas cantidades de las mismas, son capaces de estimular el proceso, lo que permitiría ser regeneradas continuamente.

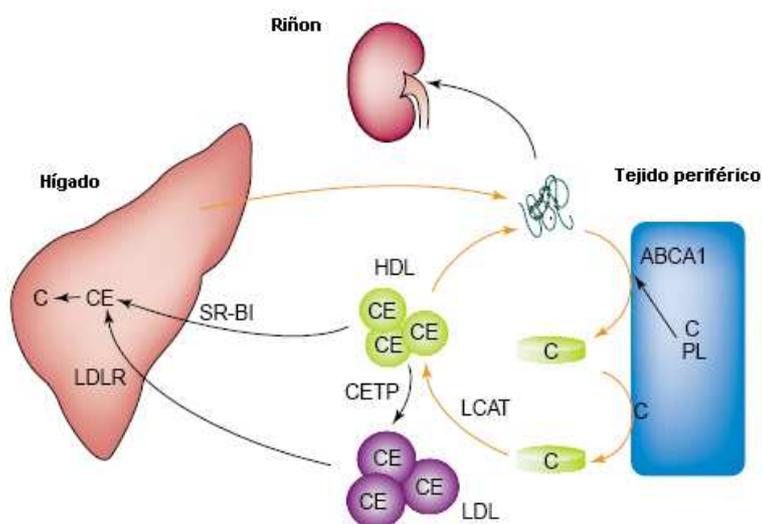


Fig. 11. se muestra en el esquema el transporte reverse de colesterol (Oram, 2002)

La figura anterior (Fig 11) es la que mejor describen el proceso fisiológico y los trastornos metabólicos de la enfermedad de Tangier. Estos pacientes producen niveles adecuados de apoA-I, pero estas moléculas son incapaces de captar fosfolípidos y colesterol de los tejidos periféricos, dado el defecto en el ABCA1. Así las preβ1-HDL nacientes no pueden dar lugar a las HDL discoidales ni a las HDL maduras, incluso inyectando HDL maduras a estos pacientes, las partículas sufren un rápido aclaramiento, probablemente porque las apolipoproteínas se disocian

sin poder regenerar HDL maduras (von Eckardstein et al., 1995). Los bajos niveles de LDL en esta patología pueden reflejar además poco intercambio de ésteres de colesterol provenientes de las HDL, como así también una disminución en la remoción de lípidos desde las membranas hacia el hígado, lo que implicaría un aumento de receptores de LDL y por lo tanto un mayor aclaramiento de las partículas en circulación. Aunque la remoción de colesterol se encuentra disminuida, los niveles del mismo en la membrana no se ven alterados, ya que depende de la síntesis y endocitosis de LDL (Brown and Goldstein, 1986). Como el mecanismo de difusión acuosa no se encuentra alterado puede ayudar a evitar la acumulación de colesterol. Los macrófagos pueden acumular ésteres de colesterol porque pueden internalizar partículas lipoproteicas por fagocitosis via receptores, que no están reprimidos en casos de excesos de colesterol, es por este motivo que a pesar de los bajos niveles de colesterol en plasma de estos pacientes, acumulan exceso de colesterol en los macrófagos (Oram, 2000).

2. OBJETIVOS

El objetivo general en esta tesis fue someter a prueba las siguientes hipótesis:

- 1) En contraposición con las dHDL obtenidas por diálisis de micelas mixtas con detergentes, aquellas generadas por la reacción directa de apoAI con vesículas lipídicas o por la interacción con células tendrían un único arreglo de la proteína en el borde del disco.
- 2) En éste, los pares de hélices Y 3-4 de cada molécula de apoAI quedarían enfrentados y en estrecho contacto entre sí.
- 3) Esto permitiría la formación de un ramillete de hélices intermolecular que constituye un dominio de inserción en membranas.
- 4) Tanto el tamaño de los discos como su contenido de colesterol podrían modular la capacidad de formar el ramillete intermolecular o el dominio de inserción activo.

2.1 Objetivos específicos

Objetivo 1. Obtener información sobre la configuración de apoAI en dHDL formadas por células en comparación con dHDL reconstituídas.

Objetivo 2. Obtener información sobre los cambios conformacionales en el dominio central de apoAI inducidos por los cambios de tamaño y composición lipídica (contenido de colesterol y fosfolípidos negativos) de las dHDL.

3. Metodología

3.1 Obtención ApoA-I plasmática

La apo A-I se obtuvo a partir de suero Humano (del Banco de Sangre del Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires, La Plata), alternando técnicas de ultra centrifugación y cromatografía de exclusión molecular (Tricerri et al., 1998), el plasma es transportado congelado, por lo tanto este es descongelado y llevado a una densidad de 1,21 gr/ml considerando el aumento de volumen por el agregado de BrNa. Se necesitan 0,282 g/ml de BrNa y 0.262g/ml de BrK para llevar a la densidad deseada.

El plasma en estas condiciones es Ultra centrifugado a 55.000 rpm durante 44 hs a 10°C de temperatura, después de la ultracentrifugación se separan las lipoproteínas flotantes que se representa en una capa superior de color naranja intenso como lo podemos ver en la siguiente imagen.

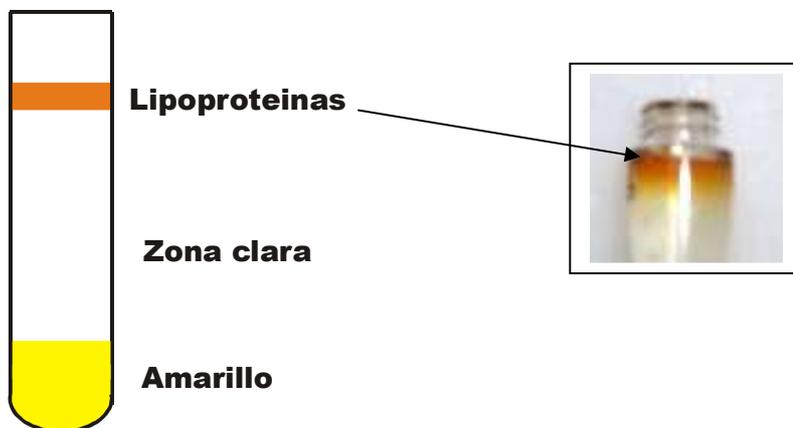


Figura 12. Obtención de lipoproteínas plasmáticas mediante ultracentrifugación

Las lipoproteínas se separan en una columna abierta de Sephacril S300 (columna de un metro de largo), eluyendo con Buffer tris 10mM; ClNa 0,15M; Azida 0,01%; pH=8. En el siguiente orden de elución: VLDL, LDL y HDL, luego las lipoproteínas HDL se dializan en membrana de diálisis PM 12.000 contra EDTA 5mM realizando cambios continuos del buffer.

Para deslipidizar la muestra, se agrega guanidina_HCl 6M, se incuba en Baño de María a 37°C durante 3 hs con bastante agitación finalizado este tiempo se deja en hielo durante 10 minutos. Esta muestra se dializa contra EDTA 5mM pH=7,4; cambiando el buffer 5 veces durante 2 días. Pasado este tiempo se Ultracentrífuga a 50.000 rpm durante 24 hs a 10°C de temperatura.

Finalmente se separa la capa superior flotante, conteniendo las HDL ricas en apo AI, para su posterior purificación. El resto del contenido del tubo, se colecta y dializa contra CO_3NH_4 5mM, cambiando el buffer varias veces siempre dependiendo del volumen total a dializar, esta mezcla de lipoproteínas ricas en apo AI se liofilizan, se pesa el liofilizado y se separa una parte para confirmar su pureza por gel de poliacrilamida al 12% con SDS.

3.2 Obtención de apoA-I Salvaje y mutantes de cisteína a partir de la expresión en cultivos bacterianos.

Tres mutantes de apo A-I (K107C, K133C y K226C) en las que los residuos de lisina de las posiciones 107, 133 y 226 fueron individualmente reemplazados por cisteína fueron construidas por mutagénesis sitio-dirigida empleando el kit Quick-Change de Stratagene. Para esto se usó PCR ADN polimerasa pfuTurbo, usando como iniciadores a pares de oligonucleótidos complementarios conteniendo la mutación, y como molde al cDNA de apo A-I inserto en un vector pET30 modificado. Los oligonucleótidos fueron diseñados de manera de poseer una adecuada temperatura de fusión (T_m), proporción de GC y o otras características de acuerdo a las instrucciones del kit; y su síntesis fue encargada a Invitrogen. El cADN de pro-apo A-I inserto en el vector pET30 fue donado por la Dra A. Jonas (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA). El vector original está diseñado de manera que contiene un sitio de clivaje por enteroquinasa para la eliminación del segmento poli-His (que se expresa fusionado a la proteína de interés y permite su purificación por cromatografía de afinidad por metales). Debido a que en ciertas condiciones existe clivaje inespecífico de apo A-I por esta enzima, en nuestro laboratorio (Prieto ED 2008, tesis doctoral) fue modificado al cADN de manera de introducirle un sitio de clivaje para medio ácido (85% ácido fórmico) que permite eliminar conjuntamente al pro segmento y al poli-His, dejando sólo la secuencia de

apoA-I madura

Los productos de PCR se controlaron por electroforesis en gel de agarosa antes y después de ser tratados con Dpn I, enzima que digiere al ADN metilado usado como molde dejando intacto al ADN amplificado en la PCR (no metilado) que contiene las mutaciones.

Los productos de PCR tratados con Dpn I se usaron para transformar bacterias supercompetentes (E coli JM109), las que se plaquearon en agar en presencia de Kanamicina para seleccionar 4 o 5 colonias. De cada colonia se obtuvo el ADN plasmídico que fue secuenciado (servicios de Macrogen y/o de la Facultad de Cs Veterinarias de la UNLP) en la región del inserto del cADN de apoA-I.

La preparación de plásmidos con la secuencia correcta (que contenían la mutación deseada y ninguna otra mutación indeseada en el cADN) fueron utilizados para transformar bacterias BL21 y sometidas a una prueba en mini-escala de expresión inducida por IPTG. La expresión de apo A-I fue reconocida en análisis de SDS-PAGE por la aparición de una banda en la región de los 35 KD (correspondiente a la pro apo A-I fusionada al segmento de polihistidina) en los extractos de los cultivos inducidos por IPTG y ausente en aquellos no inducidos con IPTG. Para cada tipo de mutación se seleccionó aquella colonia que presentaba mejor nivel de expresión de apoA-I. Esta fue fraccionada y almacenada en 20% glicerol a -80°C hasta su utilización para expresión en macro escala.

Para la expresión de las mutantes en macroescala, se utilizaron cultivos en 1 litro de medio crecidos hasta una DO de 0,6. Luego de inducir con IPTG se continuó la incubación por 2 horas y las bacterias se precipitaron por centrifugación. El precipitado de bacterias se trató con guanidina HCl 3,0 M y se volvió a centrifugar para eliminar membranas y restos celulares. El sobrenadante se dializó contra buffer fosfato 50 mM, NaCl 0,5 M pH 7,4; y se cargó en una columna de cromatografía de afinidad por metales (agarosa con NiSO₄). La columna se lavó con baja concentración de imidazol (0,05 M) y luego se eluyó a la pro-apoAI-poliHis con 0,5 M de imidazol. Esta se clivó con 85% de ácido fórmico y luego de diálisis se volvió a cargar en la columna de NiSO₄.

Ahora la columna retiene al segmento poli-His y restos de proteína no clivada, eluyéndose con baja concentración de imidazol a las proteínas clivadas con un alto grado de pureza (>95% por SDS-PAGE). Algunas condiciones tuvieron que ser ajustadas para las mutantes de cisteína ya que a diferencia de apoAI salvaje que eluye en ausencia de imidazol, la elución de las mutantes de cisteína ocurre con 0,05 M de imidazol.

3.3 Técnicas de biología molecular

3.3.1 Obtención y amplificación de vectores para clonación: plásmidos

Los plásmidos son secuencias de DNA de doble cadena, de origen bacteriano, que permiten la incorporación y manipulación de un gen específico, como en nuestro caso, el cDNA de origen eucariótico a bacterias para la expresión de la proteína de elección; en este trabajo se utilizaron los plásmidos pET30, de Novagen, cuya secuencia permite la selección de bacterias subclonadas gracias a que le confiere resistencia al antibiótico Kanamicina. En el lugar de inserción del gen (polilinker) el plásmido incorpora a la secuencia del gen una cola de polihistidina al inicio de la secuencia N-terminal de la proteína para su posterior purificación. Esta cola de polihistina es eliminada de la secuencia de aminoácido como se explicará más adelante se muestra el esquema general del plásmido en donde se observa la región del polilinker, el sitio de replicación y el gen que codifica la resistencia a kanamicina. En la parte inferior se detalla la secuencia de nucleótidos y los sitios de restricción en la región donde se inserta el gen de interés. La adición de IPTG (Isopropil Tiogaláctosido) induce al operón lac, lo que promueve la expresión del gen de la proteína insertada, junto con diferentes secuencias aminoacídicas de interés, las que facilitan su posterior purificación.

La obtención de plásmidos a partir de bacterias se realiza a pequeña escala (miniprep) obteniendo microgramos de ADN plasmídico; se utilizan para tal fin dos protocolos diferentes cuyo fundamento es la lisis alcalina con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) para producir la liberación del plásmido de las bacterias, dejando el

ADN cromosómico junto con restos de pared celular. Una vez que estos restos son separados, se purifica el ADN plasmídico a partir de la solución remanente.

Se utilizaron dos técnicas, una de bajo costo denominada casera (Sembrook and Russell, 2001), utilizada para verificar ausencia de contaminación o para obtener plásmidos para posteriores transformaciones, y la otra mediante un kit comercial de Quiagen, utilizado para obtener plásmido con una pureza considerable, adecuado para su secuenciación y posterior manipulación en biología molecular.

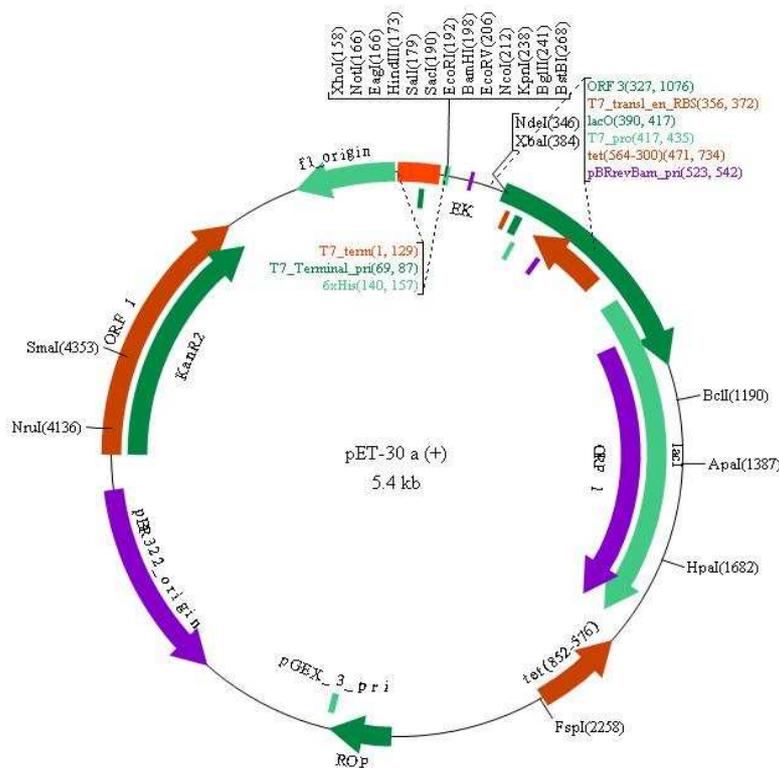


Figura 13 esquema general del plásmido PET 30 y detalle de la secuencia de nucleótidos en el polilinker

3.4 Tratamiento de bacterias para conferirles competencia

En este trabajo se utilizaron huéspedes bacterianos de expansión de plásmido (JM109) y de expresión de proteínas (BL21 DE3) de Novagen, derivados de líneas de E Coli; para cualquiera de los dos casos se requiere la incorporación del plásmido en las bacterias mediante el proceso de “transformación”, para lo cual previamente debe manipularse las mismas para hacerlas “competentes”.

La competencia de las bacterias se logra con un crecimiento a baja temperatura (24 °C) hasta una DO de 0.6 a 630 nm, y posteriores lavados con soluciones de CaCl₂-MgCl₂,

El primer paso de este proceso altera la composición lípidica de la membrana, haciéndola mas “permeable” al plásmido, se postula que CaCl₂-MgCl₂ compleja la membrana facilitando el pegado del plásmido y posterior introducción del mismo a la bacteria (Lederberg and Cohen, 1974) finalmente se almacenan en solución de glicerol estéril al 20% a -80 °C. Este protocolo es muy sencillo y económico, pero la eficiencia de transformación es baja y las bacterias pierden la competencia muy rápidamente. Otra técnica para obtener bacterias competentes es usando soluciones con RbCl, (Sembrook and Russell 2001) obteniéndose bacterias altamente competentes, pero que pierden la competencia rápidamente y el costo de las sales de rubidio es bastante elevado.

3.4.1 Transformación

El método por el cual se introduce plásmido dentro de bacterias se denomina transformación, y puede ser realizado por electroporación o shock térmico. El utilizado en este trabajo fue transformación por shock térmico. La técnica consiste en poner en contacto 0.2 ml de bacterias competentes con una solución del plásmido que no supere los 20 µl, por el término de 30 minutos a 4 °C, y luego se transfiere el tubo a un baño a 42 °C durante 90 segundos. Inmediatamente se pone el tubo en hielo y se le agrega 0.8 ml de medio SOC. Se incuba a 37 °C durante una hora, y por último se centrifuga para obtener un precipitado de bacterias, las cuales se toman con una punta de pipeta y se distribuyen en una placa de agar al 1.5 % con medio Luria- Bertani (agar -LB), el antibiótico adecuado (en nuestro caso Kanamicina 30µg/ml). Se deja la placa a temperatura ambiente por una hora, para luego incubarla por 24 horas a 37 °C para que desarrollen las bacterias transformadas, que van a ser aquellas que poseen resistencia al antibiótico por tener el plásmido. Luego se toman una a una las colonias y se las crece en medio LB líquido con antibiótico; la mitad de medio se separa para comprobación del proceso (purificación del plásmido y análisis de

secuencia ó expresión), y el resto se guarda en glicerol 20% a -80°C para su conservación.

Medio de cultivo Luria –Bertani (LB): 10 gr de triptona bacteriológica 5 gr de Extracto de levadura 10 gr de NaCl este es llevado a pH de 7.4 y a volumen de un litro, para luego se esterilizado por 15 minutos a 120°C.

Medio SOC: 20 gr de triptona bacteriológica, 5 gr de Extracto de levadura, 5 gr de Na Cl, Glucosa 20 mM. Este es llevado a volumen de un litro y se esteriliza por filtración.

3.4.2 Construcción de los mutantes de apoA-I

La amplificación de cadenas de ácidos nucleicos ha sido posible gracias al acceso de oligonucleotidos de origen sintético y a la obtención de polimerasas, este hecho ha logrado la clonación, y modificación de genes *in vitro* y en forma rápida, gracias a la denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la que permite obtener, de una región determinada del genoma, millones de copias, siempre que una parte de su secuencia sea conocida. La técnica consiste básicamente en diseñar en una primera etapa dos oligonucleotidos iniciadores o “primers” a partir de la secuencia conocida, cada uno complementario a una de las hebras de la doble hélice y en extremos opuestos.

El éxito de la técnica se logra gracias al uso de una DNA polimerasa aislada de una bacteria termófila que es estable a muy altas temperaturas, de forma tal que no se desnaturaliza al aumentar la temperatura en sucesivos ciclos. Cuando se calienta la doble hebra y posteriormente se enfría en presencia de exceso de los “primers”, se logra que estos oligonucleótidos se hibridicen o “peguen” con las secuencias complementarias de DNA genómico, luego en presencia de los cuatro desoxinucleótidos y de la DNA polimerasa, se elonge la secuencia flanqueada por los primers. Cuando se repite el procedimiento los fragmentos recién sintetizados sirven de moldes, y en pocos ciclos el producto que predomina es una secuencia única de DNA cuya longitud corresponde a la distancia de nucleótidos que hay 56 entre los primers, cada ciclo toma por lo general unos 5 minutos, por lo que el

procedimiento completo lleva unas pocas horas. El esquema general de la técnica se muestra en la Fig 14. (Sembrook and Russell, 2001).

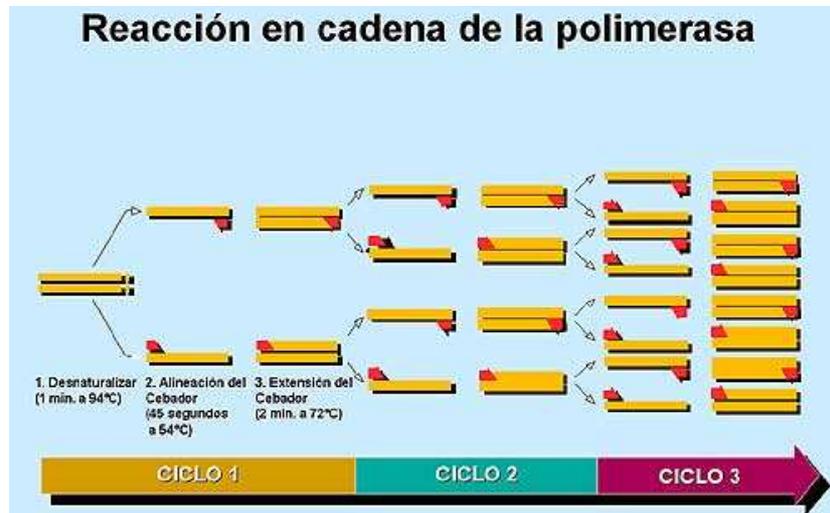


Figura 14. Esquema de amplificación de una secuencia de ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con una modificación de esta técnica se logra introducir un mutación, ya sea eliminando, agregando o cambiando los codones que codifican para aminoácidos, además de la amplificación de una región o secuencia de ADN genómico.

En este trabajo, incorporamos mutaciones puntuales en sobre la secuencia de apoA1 inserta en el vector plasmídico, utilizando en la reacción de PCR oligonucleótidos o primers complementarios que poseen el cambio requerido.

Uno de los objetivos propuestos fue la construcción de una serie de mutantes de apoA-I conteniendo un único residuo de cysteina en diferentes posiciones de su región central, a fin de estudiar la conformación de esta región y su mecanismo de inserción en membranas.

Esta serie de mutantes se realizaron por mutagénesis sitio dirigida usando el kit comercial "Quick-Change" de Stratagen. En este método se utiliza una ADN polimerasa (PfuTurbo) de muy baja tasa de error, lo que permite realizar la reacción de PCR sobre el plásmido completo.

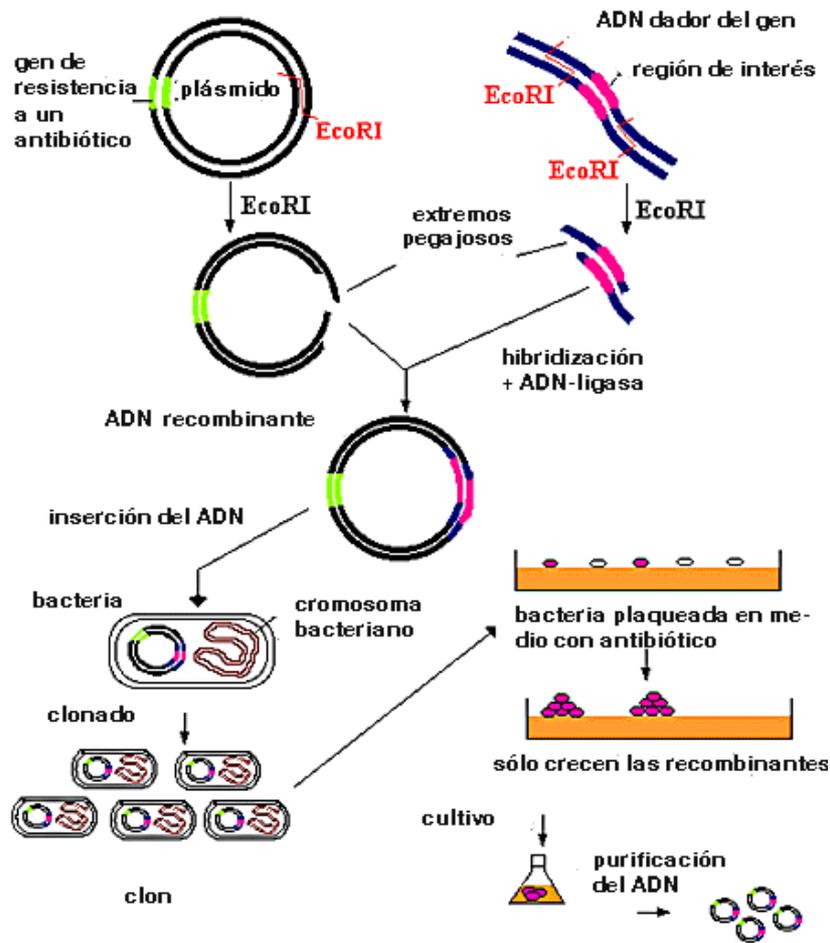


Figura 15: esquema de PCR modificada en donde se logra la mutación de un gen en un sitio específico.

3.4.3 Expresión y purificación

Una vez que los plásmidos fueron introducidos en las bacterias BL21 y verificado que las bacterias crecidas en las placas no eran contaminaciones se buscaron las condiciones de expresión y purificación. Las de mejor resultado consistieron en hacer un plaqueo en medio LB/agar con antibiótico (kanamicina), luego crecer una colonia en 5 ml de medio líquido toda la noche (ON), para después inocular 1 ml de estas bacterias en un erlenmeyer con 500 ml de medio líquido. El crecimiento se continúa hasta una densidad óptica (DO) de 0.6 a 650 nm para inducir a continuación la expresión con 0.4 μ M IPTG.

Luego de una inducción por el término de dos horas, se centrifuga y colecta todas las bacterias, y al pellet de bacterias se las lisa incubando durante 4 hs con solución de guanidina HCl 3 M, ya que una gran cantidad de proteína expresada se deposita en los cuerpos de inclusión.

Se centrifuga para eliminar membranas y restos celulares, y se dializa contra 1000 volúmenes de buffer Fosfato de Potasio 50mM, NaCl 500mM, pH 7.4 con tres cambios del buffer. Al término de la diálisis se vuelve a centrifugar para eliminar todas las proteínas insolubles en medio acuoso. El sobrenadante, si bien está muy enriquecido en la proteína recombinante, tiene una proporción considerable de contaminantes, que se eliminan por elusión a través de columnas de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). Las proteínas mutantes quedan adsorbidas a la matriz de la columna por afinidad con la cola de poli Histidina, y, posteriormente se eluyen por competencia con buffer con Imidazol.

3.4.4 Corte con Fórmico

Para eliminar esta secuencia N terminal de poli Histidina, en nuestro laboratorio (Prieto ED, Et al Protein journal en revisión) fue insertado un sitio de clivaje de el Glu, esta mutación fue introducido en el cDNA de la apoA-I este sitio de clivaje para medio ácido (85% ácido fórmico) N-terminal NH₂-1 DDPPQS5. Esta modificación genera un ácido lábil Asp-Pro enlace peptídico entre los aminoácidos 2 y 3 de la proteína, permitiendo división química específica de su N-terminal- que permite eliminar conjuntamente al pro segmento y al poli-His, dejando sólo la secuencia de apoA-I madura, todo este conjunto de cambios generó una gran desarrollo en el protocolo de expresión de Apo A-I mejorando el rendimiento y aumentando la facilidad y especificidad en la purificación.

3.5 Marcado de los mutantes con sondas fluorescentes

Los marcadores fluorescentes utilizados en esta tesis fueron *Alexa Fluor® 350, 488, 546 y 647 C 5 maleimide* de Molecular Probes, con estos marcadores se marcaron específicamente los residuos cisteína de estas mutantes en las posiciones 107,133 y 226. El uso de las mismas condiciones de la reacción con apoA-I tipo salvaje (carente

de cisteínas) nos permitió controlar la ausencia de marcado inespecífico y ajustar las condiciones de separación del exceso de reactivo. Las proteínas, en presencia de Guanidina HCl 3.0 M se trataron durante toda la noche con 0.4 mM TCEP(cloruro de tris (2-carboxietil) fosfina), reductor de grupos sulfhidrilos. Las sondas fueron agregadas en una relación de exceso molar de 5:1, sonda:proteína. Las proteínas marcadas se separaron de la sonda libre mediante el uso de concentradores centricom con un corte en la membrana de 10 K, permitiendo así retener la proteína de interés junto con la sonda unida específicamente a la proteína y eliminando la sonda en exceso, así como también se realizaron lavados con buffer fosfato 250 mM con el objetivo de lavar la guanidina y de esta manera reconstituir la proteína.

El grado de marcación se estimó de la densidad óptica a 280 nm (correspondiente a los residuos aromáticos de apo A-I) y 350,490,548.648 nm (correspondiente a cada una de las Alexas usadas) corrigiendo por la absorción que presenta cada una de las alexas a 280 nm.

Se calculó la eficiencia de marcado de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia de marcado} = f_D = [\text{sonda}]/[\text{proteína}]$$

$$[\text{sonda}] = A^{\text{máx}}_{\text{PS}} / \epsilon_{\text{sonda}}$$

$$[\text{proteína}] = \frac{A^{280} - A^{\text{máx}} \times C_f}{\epsilon_{280 \text{ prot}}}$$

Fueron utilizados los coeficientes de extinción correspondientes a cada uno de los Alexa utilizados (especificaciones de Molecular Probes). Y $\epsilon_{280 \text{ prot}} = 1.13 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para Apo A-I (calculado a partir de la secuencia primaria). (Herlax, tesis Doctoral ciencias exactas 2006).

3.6 Vesículas Lipídicas Discoidales Conteniendo Apo A-I

En primer lugar se obtuvieron liposomas multilamelares (MLV) de 1,2-dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), Para esto se prepararon films a partir de soluciones stock de los lípidos, luego de evaporarlas con N2 fueron dejadas a baja presión por dos horas para eliminar los restos de solvente, y por último fueron resuspendidas por agitación en buffer fosfato 10 mM, pH=7,6.

Condiciones de incubación: las muestras fueron preparadas agregando las mutantes de Apo A-I a vesículas a una concentración final de DMPC de 6 o 10 mM), hasta alcanzar una relación molar lípido/proteína de 40/1 a 37 °C ya que a esta temperatura la formación de discos es muy lenta. Luego la mezcla fue llevada rápidamente a 24 °C en el espectrómetro (en condiciones de Tt de la DMPC donde la reacción es rápida (Swaney and Chang, 1980), y se siguió la cinética, midiendo espectros a distintos tiempos a 350 nm dejando reaccionar durante 8 h, luego de este tiempo se les hace ciclos de temperatura que van en tres rangos: 4°C, 24°C, 30°C durante una hora a cada temperatura (una hora a cada temperatura x 4 veces).

Con iguales condiciones se llevo a cabo la preparación de los con colato solo que esta vez se agrega colato, con una relación molar proteína/lípido/colato de 1/40/60, agregándose finalmente las mutantes de Apo A-I, para luego dializarlo extensivamente contra buffer fosfato 25 mM. pH 7.4 y de esta manera eliminar el colato.

El producto de las dos reacciones se analizan por geles nativos en gel de poliacrilamida en gradiente de 4.20%.

3.7 Técnicas Electroforéticas

Cuando una molécula cargada es sometida a un campo eléctrico, ésta migrará a una velocidad que dependerá del tamaño, carga neta, forma y viscosidad del medio en el cual se mueve (Laemmli, 1970). Por lo tanto establecidas las condiciones de pH y fuerza iónica, cada molécula migrará a una única posición dentro del campo eléctrico. En la separación de moléculas de ácidos nucleicos el soporte utilizado es un gel de agarosa, mientras que para la separación de proteínas el soporte utilizado es una matriz polimerizada de acrilamida y N,N' metil-bis-(acrilamida) (PAGE) en buffer glicina usando como iniciador tetrametilenamida (TEMED) y como catalizador persulfato de amonio. Este tipo de geles es mecánicamente fuerte, termoestable y químicamente inerte. El efecto tamiz aumenta la resolución y puede graduarse fácilmente el tamaño del poro, modificando las cantidades de agente soporte.

3.7.1 Geles de Agarosa

La electroforesis de geles de agarosa se utilizó en la separación de fragmento de DNA en base a su peso molecular y a su grado de empaquetamiento; los fragmentos más pequeños migran más rápido que los de mayor tamaño, y la distancia recorrida en el gel es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular. De esta manera el tamaño puede ser determinado por calibración del gel con estándares de peso molecular conocido y comparando las distancias que migran los fragmento desconocidos.

Preparación del gel: se realizaron geles horizontales, con solución de agarosa al 0.8% en buffer TBE. Dado que la agarosa se disuelve en caliente, se prepara primero la suspensión de la misma y se la calienta en horno de microondas agitando cada 15 segundos, hasta que no se observan “grumos” de agarosa. Una vez logrado una solución homogénea se la deja enfriar hasta unos 60 °C y se la vuelca en la cama horizontal del gel, colocando el peine para formar los pocillos de siembra y dejando enfriar hasta que gelifique. Una vez logrado esto último se coloca el gel en la cuba electroforética y se la cubre con buffer TBE.

Siembra de muestras: se siembran 5 ul de las mismas (lo ideal es que tenga unos 20 ng de ADN por banda para evitar distorsiones) con 1 ul de “loading buffer” y se corre a 100 vol hasta que el frente haya recorrido aproximadamente el 80% del tamaño del gel. Para observar la presencia de ácidos nucleicos se incubó el gel por 30 minutos en solución de **SYBR Green** es un agente intercalante utilizado en la tinción de ADN para el análisis por electroforesis de productos de PCR al 10% en TBE, para luego observar las bandas por medio de luz UV de un trans iluminador.

Las soluciones utilizadas fueron:

- Solución de TBE (Tris 50 mM- Boro 50 mM- EDTA 1mM) pH 8
- Loading Buffer (6X: NaOH 300mM, 6 mM EDTA, 18 % p/v ficoll, 0.15 % p/v verde de Bromo cresol, y 0.25 % p/v Xileno Cianol)

3.7.2 Geles de Poliacrilamida

Los geles PAGE fueron utilizados para la determinación de pureza y pesos moleculares de proteínas y/o complejos lipoproteicos; para esto se utilizaron básicamente dos tipos de procedimientos: uno en condiciones salvajes y con gradiente de poliacrilamida, en donde cada proteína migra dependiendo de la relación carga/masa hasta que el tamaño del poro impide su migración; la otra variante es en condiciones desnaturizantes con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (SDS-PAGE), en donde la matriz tiene una composición constante, pero todo el sistema posee un detergente como agente desnaturizante; éste desestabiliza toda interacción no covalente de la proteínas combinándose en una relación estequiométrica (por cada 2 aminoácido 1 de SDS), independizando la carga neta que tendría la proteína a ese pH, y por lo tanto siendo la migración dependiente solamente del tamaño de la molécula.

Los protocolos de estos sistemas son:

3.7.2.1 Sistema de gel nativo para proteínas (PAGE)

El método utilizado es el de Laemmli (Laemmli, 1970). Consiste en un sistema vertical discontinuo que posee dos geles contiguos, pero distintos: el gel separador por debajo y el gel de siembra por encima, ambos distintos en fuerza iónica, pH y tamaño de poro. Esta discontinuidad sirve para concentrar grandes volúmenes de muestra en el gel de siembra, resultando en una mejor resolución final. El gel de siembra se preparó con una concentración final de 4% p/v de acrilamida, la cual se polimeriza resultando el tamaño de poro no limitante. El gel separador implica un gradiente lineal de concentración que va de 4% a 25% p/v en acrilamida. Las proteínas se detectaron coloreando con solución de Coomassie, ó tinción de plata en caso de que la cantidad de proteína sea inferior a la detectada con la primer técnica. 62

3.7.2.2 Sistema de gel desnaturante (SDS-PAGE)

Posee como el anterior dos geles contiguos, uno separador y otro resolutivo diferenciándose en las condiciones de pH, fuerza iónica y tamaño de poro, el primero posee las mismas condiciones que el nativo, excepto que posee el agente desnaturante SDS a una concentración de 0.1% p/v. El gel resolutivo consiste en un gel continuo de concentración constante, lo cual indica que el tamaño del poro es igual a lo largo del gel, este tamaño se logra variando la concentración final de acrilamida, y como el gel de siembra, posee SDS en una concentración de 0.1%. La muestra es tratada con buffer muestra que posee SDS (0.1%) y se la hierva por el término de 3 minutos, para luego correr el gel a 140 voltios. Hay que tener en cuenta que en este tipo de "corridas" la proteína no llega hasta el poro límite. La tinción es similar que en caso anterior.

Las soluciones utilizadas son:

Geles PAGE y SDS- PAGE

- Acrilamida (40% p/v)/Bis Acrilamida (0.8%)
- Buffer de gel siembra: Tris-HCl 0.125M pH 6.8
- Buffer de gel separador: Tris-HCl 0.375M pH 8.8
- Iniciador: Persulfato de amonio (10mg /100µl)
- Catalizador: TEMED
- Buffer de desarrollo: Tris-Glicina 0.025 M- Tris 0.192 M Glicina. PH 8.3.
- Colorante: Coomassie Blue g-250, 0.1 %, en ácido acético 10%, metanol 40%
- Buffer muestra: Tris 0.062M, glicerol 10%, azul de bromo fenol (0.05 mg/ml), pH 6.8

Los SDS-PAGE poseen todas las soluciones SDS de concentración 0.1%

3.8 Determinación de concentración de proteína

La determinación de concentración de proteínas fue realizada en todos los casos midiendo la absorbancia a 280 nm, después de determinar el espectro de

absorción de cada proteína desde 200 a 400 nm Este método fue elegido ya que al conocerse la secuencia de la apoA-I y de sus mutantes, se puede calcular su coeficiente de extinción dado por diversos programas accesibles por internet (www.expasy.org). Este tipo de programas calcula el coeficiente partir de la contribución individual de los aminoácidos (Trp, Tyr, Phe y Cys) de la secuencia suponiendo que se comportarán igual que en la proteína entera; se estima que el error cometido es menor al 5 % (Gill and von Hippel, 1989). Otras de las ventajas de este método es que no se pierde muestra y del espectro se puede observar la calidad de la misma. Este método se ha comparado con los convencionales Lowry y/o Bradford, no observándose diferencia significativa, más allá de las limitaciones de estos últimos.

3.9 Espectroscopia de resonancia Electrónica

La mayor cantidad de moléculas o átomos poseen todos sus electrones apareados a los que se denominan diamagnéticos, sin embargo en los sistemas biológicos existen dos clases de moléculas que poseen electrones desapareados, denominados paramagnéticas: radicales libres, y metales de transición. La característica básica de la Resonancia Electrónica Paramagnética es su capacidad de detectar electrones desapareados, siendo la propiedad esencial detectada el momento magnético asociado con el spin del electrón.

Si se coloca una sustancia en un campo magnético de intensidad H, el campo inducido B dentro de la misma, esta dado por

$$B= H + 4 M \quad (1)$$

siendo M la susceptibilidad magnética

Si se divide la ecuación anterior por H, entonces tenemos $\mu= 1+4 k$, en donde k es la magnetización por unidad de volumen ($k=M/H$). Si ésta no depende del campo aplicado y además es positiva, la sustancia es paramagnética y concentra las líneas de fuerza dentro de la sustancia, si es negativa, la sustancia es diamagnética y dispersa las líneas de fuerza.

Para cada electrón desapareado, el espín es $S = 1/2$ y su energía sin campo eléctrico es E_0 , cuando se aplica un campo los espines de los electrones se acomodan paralelos o antiparalelos al campo aplicado, siendo su energía

$$E = E_0 + m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot H \quad (2) \quad \text{ó} \quad E = E_0 - m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot H \quad (3)$$

en donde m_s (espín del electrón), g (factor espectroscópico) y μ_B (magnetón de Bohr que convierte las unidades de momento angular en momento magnético) son constantes, y H es el campo que "ve" el electrón. (McMillan, 1975)

La representación esquemática de los niveles energéticos que pueda adquirir cada electrón en función del campo H se muestra en la figura III-6 a continuación.

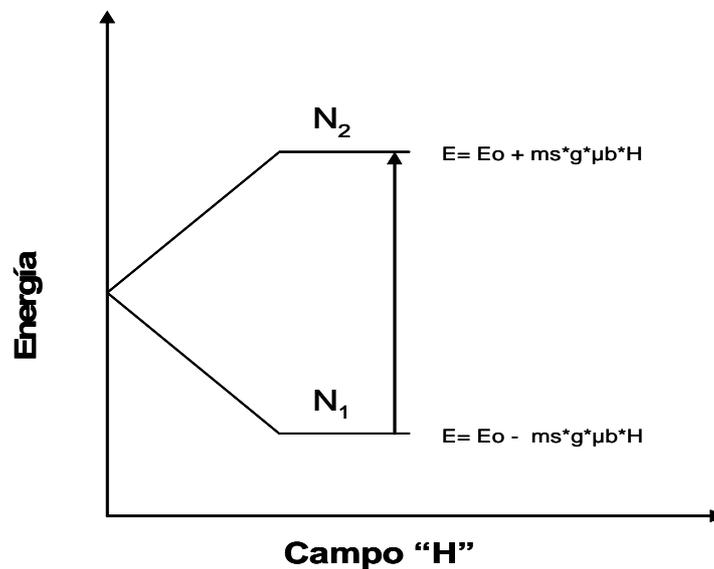


Figura 16 División de niveles de energía en un campo magnético

La diferencia de energía que existe entre los dos niveles está dada por

$$\Delta E = g \cdot \mu_B \cdot B \quad (4) \quad (\text{interacción de Zeeman}).$$

Si conjuntamente con el campo magnético externo se aplica una radiación electromagnética, esta será absorbida y se inducirá la transición del nivel inferior al superior, y se producirá la condición de resonancia cuando el cuanto radiación de valor $h \cdot \nu$ (donde h y ν son la cte de Plank y la frecuencia de la radiación) sea igual

a: $h\nu = g\mu_B H$ (5) (en las ecuaciones puede aparecer indistintamente H o B, ya que estrictamente es B es el valor de campo que “ve” el electrón). Así los espectros de EPR pueden ser determinados igualmente manteniendo la intensidad del campo magnético aplicado H y variando la frecuencia de radiación ν ; o la inversa, manteniendo fija la frecuencia de radiación ν y variando el campo B. Ya que las lámparas comerciales solo pueden “barrer” un estrecho margen de frecuencias (8-10 GHz), normalmente se utiliza la opción de “Barrer” el campo magnético. De esta última manera es como funciona la mayoría de espectrómetros de EPR. De acuerdo con la última ecuación (5) la condición de resonancia se podrá cumplir con cualquier radiación electromagnética, simplemente aplicando la adecuada intensidad del campo. Sin embargo la intensidad de absorción depende de la diferencia de población entre los niveles, por lo que la distribución de población está dada por la diferencia de energía entre los niveles a una determinada temperatura:

$$N_2/N_1 = e^{-h\nu/kT} \text{ (6).}$$

Así para aumentar la sensibilidad del método se trabaja a alta intensidad de campo (como ser a 0.3- 1.2 T) y en regiones radiación de baja frecuencia. Algunos espectrómetros trabajan en la región de radio frecuencia, mientras que otros en la región de microondas (como ser entre 9×10^9 - 3.6×10^{10} Hz, correspondiente a longitudes de onda que van desde 3.0 a 0.75 cm). La señal detectada en los espectros de EPR se analiza como la derivada del espectro de absorción.

Muchos tipos de interacciones pueden ocurrir en un sistema paramagnético, dependiendo de la naturaleza del sistema y del medio en que se encuentra. Las interacciones pueden ser intra- ó intermoleculares, estas últimas pueden ser evitadas usando muestras en que la sustancia paramagnética está lo suficientemente diluida en una sustancia diamagnética. Una interacción de Zeeman pura producirá únicamente dos niveles de energía, y el espectro de EPR consistirá en una sola línea de absorción. Además de la interacción de Zeeman, puede ocurrir interacción entre el electrón y el momento magnético del núcleo (acoplamiento hiperfino), y en caso de moléculas con más de un electrón

desapareado, pueden ocurrir interacciones entre sus spines. En ambos casos se puede producir una separación en varias líneas de absorción (splitting). Solamente se va a discutir la interacción entre los electrones desapareados con su núcleo, ya que los marcadores de spines utilizados, poseen solamente un electrón desapareado.

La interacción hiperfina surge de la interacción entre el electrón desapareado con el momento magnético del núcleo del algún átomo con el cual su órbita está asociada cuando este electrón siente un campo magnético total diferente a las $2I+1$ orientaciones posibles que puede asumir el momento magnético del nuclear. Para un electrón desapareado interactuando con un núcleo de spin I , se producirá la separación de cada nivel Zeeman en $2I+1$ diferentes subniveles.

Si por ejemplo el espín del electrón es $1/2$ y el del núcleo es $1/2$, el electrón va a experimentar un efecto conjunto con el campo aplicado y con el inducido por el núcleo, y la energía de los electrones sería:

$$E = E_0 + m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot B + m_s \cdot m_I \cdot A \quad (7)$$

en donde m_s es el momento magnético del electrón, y m_I es el momento magnético del núcleo. De acuerdo a las condiciones de medida, el espectro en este caso será de dos líneas de igual intensidad, y la separación entre las líneas será proporcional a la interacción núcleo-electrón se denomina constante de acoplamiento hiperfino ("A" en la ecuación 7) y no depende del campo aplicado siempre que éste sea lo suficientemente fuerte para cuantificar por separado los momentos magnéticos del electrón (S) y del núcleo (I); esto no se cumple cuando los spines nucleares y electrónicos se acoplan para dar un solo número cuántico "F".

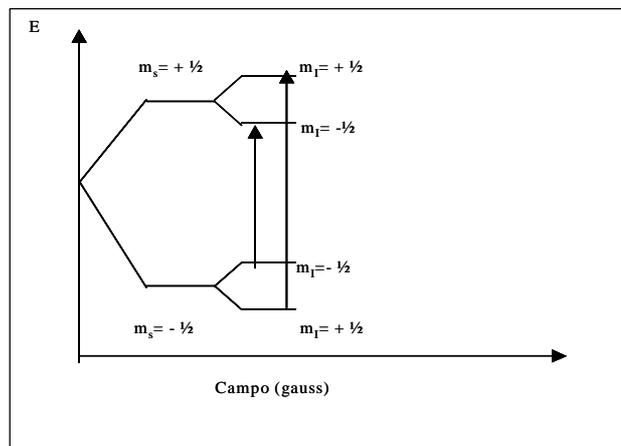


Figura 17, esquema de división de los niveles Zeeman por interacción del electrón desapareado con el momento magnético nuclear $I = 1/2$

Los átomos que constituyen los sistemas biológicos con spines nucleares no nulos son el H ($I=1/2$), N ($I=1$), F ($I=1/2$), el C y el O en sus isótopos abundante no poseen, pero si lo poseen los isótopos ^{13}C ($I=1/2$) y ^{17}O ($I=5/2$)

Las transiciones posibles son $\Delta m_s = 1$ $\Delta m_l = 0$

La medición del espectro nos permite obtener información sobre el medio ambiente que rodea al electrón desapareado. Existen dos tipos de interacciones que pueden contribuir a la forma del espectro: Interacciones “spin-Lattice”, y las interacciones “spin-spin”. Las primeras representan las interacciones que tienen lugar entre el electrón y el medio ambiente que lo rodea, ya sea de la red cristalina o del resto de la molécula en que se encuentra. Estas interacciones hacen que la energía captada por el electrón se relaje en el medio ó sistema molecular y por lo tanto el proceso es continuo. Este proceso acorta los tiempos de vida de los niveles excitados produciendo (por el principio de incertidumbre) un ensanchamiento de líneas espectrales. El tiempo de correlación longitudinal ó de spin-lattice (T₁) es el tiempo que lleva a perder el electrón 1/e de la energía absorbida y está relacionado con la inversa del ancho de banda. Cuando existe baja intensidad de radiación (para evitar saturación del sistema), los anchos de líneas son causados por otros mecanismos que modulan la energía sin causar

transición entre ellos, estos mecanismos mantienen la energía de Zeeman constante en contraste con la interacción spin-lattice y están caracterizados por el tiempo de correlación transversal (T_2), produciendo una curva de absorción Lorentziana, que esta relacionada directamente proporcional con la distancia de pico a pico de la curva derivada.

Las interacciones spin-spin están relacionadas con todos los mecanismos por los cuales el electrón puede intercambiar energía entre ellos, una aplicación de la medida de esta interacción es poder medir la difusión transversal y no serán discutidos en este trabajo.

3.10 Fluorescencia (Lakowicz, J.R., 1999)

La luminiscencia es la emisión de fotones desde estados electrónicamente excitados. Esta se divide en dos tipos, dependiendo de la naturaleza del estado basal y del estado excitado. En un estado singulete (o singlete) el electrón en el orbital de energía superior tiene la orientación opuesta al del segundo electrón del estado energético inferior, por lo que se dice que estos dos electrones están apareados. Si el electrón en el estado excitado tiene la orientación igual al del estado energético inferior, se dice que estos dos están desapareados, y el sistema será un triplete. El retorno al estado basal de un estado singlete, no requiere que el electrón cambie de orientación, sin embargo si el retorno es desde un estado triplete requerirá que el electrón cambie de orientación. La fluorescencia es la emisión que resulta del regreso un electrón apareado a su nivel basal. Estas transiciones están cuánticamente "permitidas", y la velocidad de emisión son del orden de 10^8 sec^{-1} , por lo que la vida media del estado excitado es del orden de 10^{-8} seg. (10nseg). La Fosforescencia es la emisión resultante del retorno de estados excitados de distinta multiplicidad, generalmente de estados excitados tripletes que retornan a estados basales singuletes, dicha transición no esta "cuánticamente" permitida y la emisión es muy lenta, por lo que se traduce en vidas medias de los estados excitados en el orden de msec. Las sustancias que poseen capacidad fluorescente, poseen por lo general electrones deslocalizados, típicamente en dobles enlaces conjugados.

Lo antes dicho está esquematizado en los diagramas de A. Jablonski

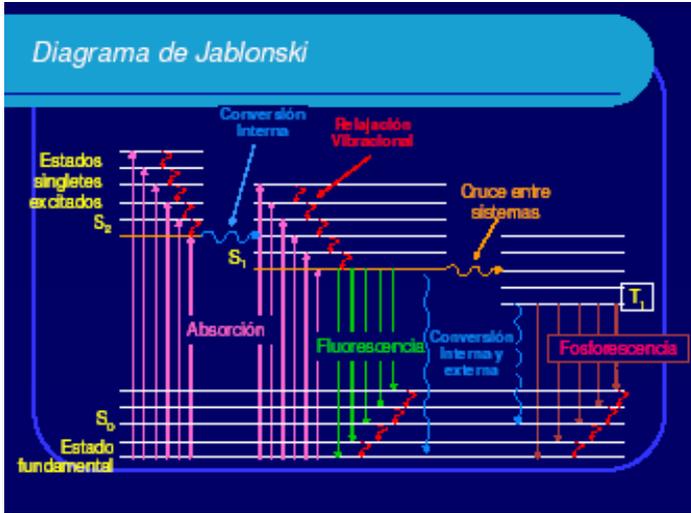


Figura 18 Los estados basales están representados por S0, mientras que los primeros estados electrónicos superiores son S1 y S2; en los fluoróforos pueden existir diferentes estados vibracionales determinados por 1,2,3,etc. La absorción está representada en forma vertical ascendente, ya que ilustra a la absorción como un proceso instantáneo, dicho proceso ocurre en el orden de 10-15 seg. Que es un tiempo muy corto para que se produzca un desplazamiento nuclear significativo.

La distribución de Boltzman describe la relación de moléculas existente entre los estados vibracionales 0 y 1

$$R = e^{-\Delta E/kT}$$

En donde ΔE es la diferencia de energía entre los dos niveles, y el producto kT es la energía térmica del sistema, entonces a temperatura ambiente o por lo general, la de trabajo, el valor de $R=0.01$, por lo que la absorción ocurre desde el nivel inferior.

Luego de la absorción de luz, pueden ocurrir varios procesos. Entre ellos puede ocurrir que un fluoróforo es excitado a niveles vibracionales superiores a S1 o también a S2. Salvo por excepciones, las moléculas suelen relajarse rápidamente a los niveles vibracionales inferiores de S1. Este proceso se llama ínter conversión interna que ocurre en 10–12 seg. Este tiempo relativamente corto en relación a la vida media de la fluorescencia, hace que la conversión interna ocurra casi completamente previa a la emisión. Así la emisión de fluorescencia ocurre desde estados excitados térmicamente equilibrados. La desexcitación ocurre asimismo a niveles vibracionales superiores de S0, ocurriendo la conversión interna a posteriori.

Los espectros de fluorescencia son presentados como espectros de emisión, en los cuales se determina el cambio de intensidad de fluorescencia en función de la

longitud de onda, esta emisión dependerá de la estructura química del fluoróforo y del solvente en que se encuentre disuelto, como también del entorno en que se encuentre. A fin de estudiar estructura proteica puede utilizarse fluoróforos sintéticos (fluoresceína, etc), ó utilizar la capacidad de fluorescencia intrínseca de algunos aminoácidos, como ser Tirosina (Tyr), Triptofano (Trp) o Fenilalanina (Phe) dada por los grupos aromáticos que estos aminoácidos poseen



Figura 19 Se muestran los grupos aromáticos de los aminoácidos fluorescentes

El grupo indol del Trp es el que hace que las proteínas absorban y emitan luz en la región del Ultra violeta del espectro. La Tyr tiene una intensidad de emisión similar a la del Trp, pero su máximo de emisión está dada en longitudes de onda menores que la de éste y puede ser quencheda (apagada) su fluorescencia por interacciones con péptidos o por transferencia de energía (ver mas adelante) con el Trp, además la misma aumenta en proteína desnaturalizadas, debido a cambios en el pKa del fenol que favorecerían el estado excitado. La fluorescencia de la fenilalanina adquiere importancia cuando en proteínas no existe residuos de Trp o de Tyr, cosa que raramente ocurre. La emisión del Trp es altamente sensible al ambiente que lo rodea, sufriendo un corrimiento hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo del espectro) cuando el medio al que se expone este residuo es acuoso. La fluorescencia del Trp puede ser quencheda por diferentes grupos, como ser I⁻, acilamida, grupos disulfuro o radicales libres como los nitroxilos utilizados en EPR.

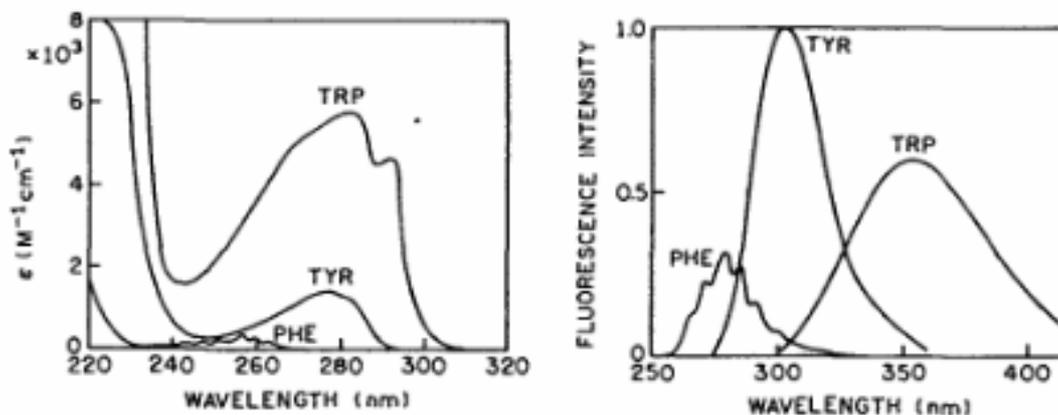


Figura 20, Espectros de absorción y de emisión de los mismos en un medio acuoso abajo se sintetiza en la tabla las características espectrales de los aminoácidos mencionados en solución acuosa a pH 7.

En este trabajo se estudió la información espectral de cada uno de los marcadores Alexa utilizados en esta tesis mediante la intensidad de fluorescencia, o el corrimiento del máximo de emisión. La primera depende de la concentración de fluoróforo, de la interacción del mismo con su entorno, de la transferencia de energía con la misma especie o con otra, etc y por lo tanto del rendimiento cuántico.

El segundo proceso es llamado corrimiento de Stokes. Excepto para átomos en fase vapor, una observación que siempre ocurre en fluorescencia es la emisión a longitudes de onda mayores que la de excitación, o sea que la emisión es con pérdida de energía. Este proceso puede tener varias causas; una causa común es el rápido descenso a los niveles vibracionales más bajos de S1, es más, los fluoróforos muchas veces caen a niveles vibracionales de S0 (ver fig. 18), resultando en pérdidas adicionales de energía; los fluoróforos pueden presentar además, corrimientos adicionales debido a la relajación de los estados excitados ocasionados por solventes polares, ó sufrir reacciones químicas durante el estado excitado.

3.10.1 Anisotropía de fluorescencia

Los fluoróforos por lo general absorben fotones cuyos vectores eléctricos se encuentran alineados paralelos al momento de transición del fluoróforo. En una solución isotrópica, los fluoróforos son moléculas orientadas al azar. Si se irradia moléculas con luz polarizada, se seleccionarán selectivamente aquellas cuyos dipolos de absorción se encuentren paralelos al vector eléctrico de excitación. Esta “selección selectiva” o foto selección de moléculas parcialmente orientadas, resulta en la emisión de luz parcialmente polarizada. Los momentos de transición para la absorción y la emisión tiene orientaciones fijas para cada fluoróforo, y el ángulo relativo entre estos momentos determina la máxima anisotropía medida. La anisotropía de fluorescencia esta definida por

$$r=(I_v-I_H)/(I_v+2I_H)$$

en donde I_v e I_H son las intensidades de fluorescencia de las emisiones de luz polarizadas vertical y horizontalmente, respectivamente. Debido a la foto selección de los fluoróforos, la anisotropía puede tomar valores entre -0.2 y 0.4 . La disminución de anisotropía está dada generalmente por movilidad o difusión rotacional del fluoróforo que ocurren durante la vida media del estado excitado y desplazan el dipolo de emisión de la molécula. Otro proceso de disminución de anisotropía ó despolarización es la transferencia de energía.

3.10.2 Transferencia de energía

Es el proceso por el cual la energía de una molécula excitada o donador, es cedida a otra que actúa como aceptor, esta transferencia ocurre sin emisión de fotones y es el resultado, primariamente de la interacción dipolo-dipolo entre el donador y el aceptor. El grado de transferencia de energía depende del solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor, la orientación relativa entre los dipolos de transición de ambos, y de la distancia entre ambas moléculas. Esta dependencia de la distancia es lo que hace a esta medida sumamente útil, ya

que permite determinar la distancia entre las moléculas que actúa como donador y la actúa como aceptor.

La velocidad de transferencia de energía desde un donador a un aceptor (K_t), está dada por:

$$K_t = 1/\tau (R_0/r)^6$$

en donde τ es el tiempo de vida medio del donador en ausencia del aceptor, "r" es la distancia entre ambas moléculas y R_0 es una distancia característica, llamada de Förster, que es la distancia en donde la eficiencia de transferencia de energía es del 50%. Esta dependencia es útil para distancias que van desde 20 a 50 Å, las que son típicas ó comparables a distancias intramoleculares en proteínas y al espesor de las membranas biológicas.

La transferencia de energía puede ocurrir entre moléculas químicamente diferentes, llamándose Hetero transferencia, o entre moléculas iguales, denominándose Homo transferencia. Este tipo de transferencia ocurre en fluoróforos cuyos espectros de absorción y emisión están en cierto grado solapados. En este trabajo se ha usado la medida de homo y hetero transferencia para determinar la cercanía de fluoróforos.

Usualmente la determinación de transferencia de energía es por medio de la observación en cambios de intensidad o en la vida media de las moléculas aceptor o donador, estas observaciones se aplican cuando las moléculas son diferentes, o sea para heterotransferencia de energía. Cuando se determina homotransferencia, como por ejemplo ser el caso del mismo fluoróforo en cada una de las posiciones en las proteínas, se dificulta la observación de este efecto y se determina en cambio eficiencia de transferencia basada en anisotropía. Fluoróforos que exhiben pequeños corrimientos de Stokes (corrimiento de stokes es depolarización en ambiente polar) (cierto grado de solapamiento entre espectros de excitación y emisión), pueden sufrir homotransferencia, la que puede ser detectada por la depolarización resultante de la emisión. (Weber, 1960) (Hamman et al., 1996).

La eficiencia de la transferencia de energía en ese caso puede ser determinada mediante la determinación de anisotropía en presencia y en ausencia de transferencia, según la expresión

$$E = 2(r_0 - \langle r \rangle) / r_0 \quad (\text{Hamman et al., 1996})$$

donde r_0 y $\langle r \rangle$ son las anisotropías en ausencia y presencia de homotransferencia, respectivamente. Como fue descrito por Weber (Weber, 1960), la homotransferencia desaparece cuando se excita en el extremo rojo de espectro.

3.10.3 Quenching o apagado de fluorescencia

La intensidad de fluorescencia puede decaer por varios procesos, dichos procesos se denominan quenching o apagamiento de la fluorescencia, y ocurre cuando el fluoróforo excitado vuelve al estado basal sin emitir fotones debido al contacto con la molécula “quencheadora” ó apagadora.

Existen dos procesos por el cual el quenching puede ocurrir, uno en donde la molécula en su estado excitado le transfiere energía al quencher cuando colisiona, denominándose el proceso “quenching dinámico ó colisional”, o cuando el fluoróforo en su estado fundamental forma un complejo con el quencher, el cual se relaja por procesos que no emiten fotones (ver Figura 21).



Figura 21, esquematización de diferentes procesos por lo cual la fluorescencia puede ser apagada.

Existen muchos tipos de moléculas apagadoras o amortiguadoras, pero es importante que no todas actúan sobre todos los fluoróforos. El decaimiento de la intensidad de fluorescencia está descrito por la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0/F=1+K[Q],$$

en donde F_0 es la intensidad del fluoróforo en ausencia del quencher, F es la intensidad en presencia del mismo y K la constante de Quenching.

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de mutantes de cisteína para determinar distancias intermoleculares en HDL discoidales.

4. 1. 1. Racionalidad de la elección de las mutaciones a realizar

El primer objetivo planteado para esta tesis fue contrastar la hipótesis planteada de que la configuración adoptada por apoA-I en HDL discoidales depende del método de reconstitución, y que la configuración adoptada en dHDL reconstituídas en ausencia de detergentes sería la LL5/2, en contraposición a la LL5/5 que es la que ocurre en los cristales de apoA-I Δ 1-43 y sería la mayoritaria en dHDL reconstituídas por diálisis con colato.

Para ello, nos propusimos obtener una serie de mutantes de cisteína a las que se le pudieran unir covalentemente grupos fluorescentes y/o paramagnéticos en posiciones estratégicas de manera que a través de la estimación de distancias intermoleculares permitan distinguir entre las configuraciones LL5/2 y LL5/5.

En primer lugar, el residuo seleccionado para ser introducido es cisteína por la razón de que su grupo tiol (-SH) puede reaccionar específicamente con grupos como maleimida, lo que facilita la marcación específica con derivados maleimilados de sondas fluorescentes o paramagnéticas. Además, como apoA-I salvaje carece de residuos cisteína, es de esperar que la introducción del mismo en determinadas posiciones estratégicas permitirán su marcación específica con derivados maleimilados.

En cuanto a los residuos de apoAI a ser substituídos por cisteína, nos propusimos en principio marcar las caras hidrofílicas de las hélices anfipáticas de apoA-I, seleccionándose las posiciones 107, 133 y 226. La racionalidad de elegir estas posiciones es que como puede verse en el esquema de la figura 22, los residuos de la posición 107 de ambas moléculas de apoAI se encuentran muy cercanos entre sí en la configuración LL5/2, pero más alejados en la configuración LL5/5. Es de esperar lo contrario para los residuos de la posición 133, que estarán muy cercanos en la configuración 5/5 y alejados en la 5/2. Los residuos 226, en cambio se encontrarían a una distancia intermedia que no sufre un gran cambio entre

ambas configuraciones. Así, pensamos en principio que con las mutantes K107C y K133C podrían obtenerse derivados fluorescentes o paramagnéticos altamente sensitivos para distinguir entre ambas configuraciones. La mutante K226C, que sería insensible, nos serviría como un control negativo.

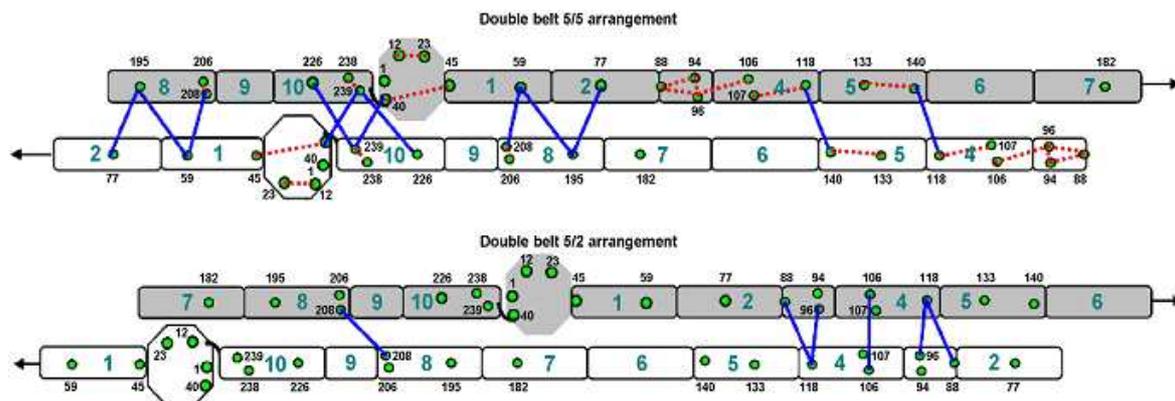


Figura 22. Modelo del "doble cinturón" en las configuraciones 5/5 (arriba) y 5/2 (debajo).

4. 1. 2. Mutagénesis sitio-dirigida

ApoA-I es expresada en la forma de un precursor (pre-pro-apoA-I) con una secuencia extra de 24 residuos en el extremo N (figura 23). Antes de la secreción por hígado o intestino, el precursor sufre el clivaje de un pre-segmento de 18 residuos (péptido señal que la destina al retículo endoplásmico y la vía secretoria) generando pro-apoA-I. Ya en circulación, se produce un segundo clivaje que libera un hexapéptido y genera la proteína madura de 243 residuos. La función del hexapéptido de pro-apoA-I no es conocida, y se ha reportado un comportamiento muy similar entre apoA-I madura y pro-apoA-I en estudios funcionales y estructurales. Debido a su mejor nivel de expresión en bacterias, pro-apoA-I se usó en muchos estudios con la proteína recombinante. En la figura 24 se muestra la región codificante del cDNA de pro-apoA-I inserto en el vector pET-30 donada por la Dra. Ana Jonas. Con ella se expresa una proteína de fusión con 52 residuos extras en relación a apoA-I madura. Contiene en el extremo N un segmento poli-His unido a través de una secuencia de 40 residuos a pro-apoA-I. El diseño de esta construcción permite el clivaje con enteroquinasa de los primeros 44 residuos generando a la pro-apoA-I con 2 residuos extras en el extremo N. El clivaje con entero-

quinasa, sin embargo, no es absolutamente específico a menos que se combine previamente con lípidos a la proteína de fusión. (75)

```

5'-AGAGACTGCGAGAAGGAGGTCCCCACGGCCCTTCAGG ATG AAA GCT GCG GTG CTG ACC TTG GCC GTG CTC TTC
      región 5' no traducida      M K A A V L T L A V L F
No de residuo                    -24 -23 -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14 -13

CTG ACG GGG AGC CAG GCT CGG CAT TTC TGG CAG CAA GAT GAA CCC CCC CAG AGC CCC TGG GAT CGA GTG
L T G S Q A R H F W Q Q D E P P Q S P W D R V
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

AAG GAC CTG GCC ACT GTG TAC GTG GAT GTG CTC AAA GAC AGC GGC AGA GAC TAT GTG TCC CAG TTT GAA
K D L A T V Y V D V L K D S G R D Y V S Q F E
12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34

GGC TCC GCC TTG GGA AAA CAG CTA AAC CTA AAG CTC CTT GAC AAC TGG GAC AGC GTG ACC TCC ACC TTC
G S A L G K Q L N L K L L D N W D S V T S T F
35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57

AGC AAG CTG CGC GAA CAG CTC GGC CCT GTG ACC CAG GAG TTC TGG GAT AAC CTG GAA AAG GAG ACA GAG
S K L R E Q L G P V T Q E F W D N L E K E T E
58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

GGC CTG AGG CAG GAG ATG AGC AAG GAT CTG GAG GAG GTG AAG GCC AAG GTG CAG CCC TAC CTG GAC GAC
G L R Q E M S K D L E E V K A K V Q P Y L D D
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103

TTC CAG AAG AAG TGG CAG GAG GAG ATG GAG CTC TAC CGC CAG AAG GTG GAG CCG CTG CGC GCA GAG CTC
F Q K K W Q E E M E L Y R Q K V E P L R A E L
104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126

CAA GAG GGC GCG CGC CAG AAG CTG CAC GAG CTG CAA GAG AAG CTG AGC CCA CTG GGC GAG GAG ATG CGC
Q E G A R Q K L H E L Q E K L S P L G E E M R
127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149

GAC CGC GCG CGC GCC CAT GTG GAC GCG CTG CGC ACG CAT CTG GCC CCC TAC AGC GAC GAG CTG CGC CAG
D R A R A H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q
150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172

CGC TTG GCC GCG CGC CTT GAG GCT CTC AAG GAG AAC GGC GGC GCC AGA CTG GCC GAG TAC CAC GCC AAG
R L A A R L E A L K E N G G A R L A E Y H A K
173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195

GCC ACC GAG CAT CTG AGC ACG CTC AGC GAG AAG GCC AAG CCC GCG CTC GAG GAC CTC CGC CAA GGC CTG
A T E H L S T L S E K A K P A L E D L R Q G I
196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218

CTG CCC GTG CTG GAG AGC TTC AAG GTC AGC TTC CTG AGC GCT CTC GAG GAG TAC ACT AAG AAG CTC AAC
L P V L E S F K V S F L S A L E E Y T K K L N
219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241

ACC CAG TGA GGCGCCCGCCGCCCCCTTCCCGGTGCTCAGAATAAACGTTTCCAAAGTGGG....
T Q FIN      región 3' no traducida
242 243

```

Figura 23. Secuencia nucleotídica del cDNA correspondiente al mRNA de pre-pro-apoA-I humana y su traducción. La traducción de este mRNA en hígado e intestino genera una proteína precursora de 267 residuos. El pre-péptido de 18 residuos resaltado en rojo es clivado antes de la secreción mientras que el hexapéptido indicado en amarillo es clivado en circulación para generar la proteína madura de 243 residuos indicada en verde.

ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT TCT TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT
 M H H H H H H S S G L V P R G S G M K E T A A
 -52 -51 -50 -49 -48 -47 -46 -45 -44 -43 -42 -41 -40 -39 -38 -37 -36 -35 -34 -33 -32 -31 -30

 GCT AAA TTC GAA CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC GAC AAG GCC ATG
 A K F E R Q H M D D P D L G T D D D D D K A M
 -29 -28 -27 -26 -25 -24 -23 -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7

 GCC CAT TTC TGG CAG CAA GAT GAA/GAT CCC CCC CAG AGC CCC TGG GAT CGA GTG AAG GAC CTG GCC ACT
 A H F W Q Q D E / D P P Q S P W D R V K D L A T
 -6 -5 -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

 GTG TAC GTG GAT GTG CTC AAA GAC AGC GGC AGA GAC TAT GTG TCC CAG TTT GAA GGC TCC GCC TTG GGA
 V Y V D V L K D S G R D Y V S Q F E G S A L G
 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

 AAA CAG CTA AAC CTA AAG CTT CTT GAC AAC TGG GAC AGC GTG ACC TCC ACC TTC AGC AAG CTG CGC GAA
 K Q L N L K L L D N W D S V T S T F S K L R E
 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62

 CAG CTC GGC CCT GTG ACC CAG GAG TTC TGG GAT AAC CTG GAA AAG GAG ACA GAG GGC CTG AGG CAG GAG
 Q L G P V T Q E F W D N L E K E T E G L R Q E
 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85

 ATG AGC AAG GAT CTG GAG GAG GTG AAG GCC AAG GTG CAG CCC TAC CTG GAC GAC TTC CAG AAG AAG/TGT
 M S K D L E E V K A K V Q P Y L D D F Q K K / C
 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107

 TGG CAG GAG GAG ATG GAG CTC TAC CGC CAG AAG GTG GAG CCG CTG CGC GCA GAG CTC CAA GAG GGC CGC
 W Q E E M E L Y R Q K V E P L R A E L Q E G A
 108 109 110 111 112 112 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130

 CGC CAG AAG/TGT CTG CAC GAG CTG CAA GAG AAG CTG AGC CCA CTG GGC GAG GAG ATG CGC GAC CGC GCG
 R Q K / C L H E L Q E K L S P L G E E M R D R A
 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152

 CGC GCC CAT GTG GAC GCG CTG CGC ACG CAT CTG GCC CCC TAC AGC GAC GAG CTG CGC CAG CGC TTG GCC
 R A H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q R L A
 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175

 GCG CGC CTT GAG GCT CTC AAG GAG AAC GGC GGC GCC AGA CTG GCC GAG TAC CAC GCC AAG GCC ACC GAG
 A R L E A L K E N G G A R L A E Y H A K A T E
 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198

 CAT CTG AGC ACG CTC AGC GAG AAG GCC AAG CCC GCG CTC GAG GAC CTC CGC CAA GGC CTG CTG CCC GTG
 H L S T L S E K A K P A L L E D L R Q G L L P V
 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221

 CTG GAG AGC TTC AAG/TGT GTC AGC TTC CTG AGC GCT CTC GAG GAG TAC ACT AAG AAG CTC AAC ACC CAG
 L E S F K / C V S F L S A L E E Y T K K L N T Q
 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243

TAA TAAGCTTGGCCCGC....
 FIN región no traducida

Figura 24. Secuencia de la región codificante del cDNA de pro-apo A-I humana en el vector pET30. La construcción expresa una secuencia poli-His en el extremo N (en amarillo) fusionada a pro-apoA-I. Esta puede ser clivada con enteroquinasa a la derecha del sitio de reconocimiento DDDDK (en rojo). En verde se muestra la modificación (E2D) realizada para crear un enlace peptídico Asp-Pro clivable con ácido fórmico. La construcción con esta modificación se usó como molde para realizar los cambios en las mutantes K107C, K133C y K226C (en azul). En la secuencia nucleotídica, las regiones marcadas en celeste indican los primers usados en las reacciones de PCR.

Una opción alternativa que se usó en este laboratorio (Prieto ED, Garda HA. *Biochemistry*. 2011.(77)), es una construcción (donada por SW Davidson) que contiene un sitio de proteólisis para IgA proteasa (o Igasa) justo antes del comienzo de la secuencia de apoA1 madura. Si bien esto tiene la ventaja de generar apoA-I madura, Igasa es una enzima de muy alto costo y demasiado inestable, perdiendo hasta el 90% de su actividad durante el transporte desde el país de origen. Por tal motivo, se modificó la construcción donada por A. Jonas con la mutación puntual E2D (ver figura 24) para generar una unión peptídica Asp-Pro clivable con ácido fórmico. Es de notar que la proteína final obtenida luego del clivaje con ácido fórmico es idéntica a apo A-I salvaje salvo en que carece de los dos primeros residuos (aspártico y glutámico). La caracterización de esta proteína, sin embargo, mostró propiedades estructurales y funcionales muy similares a apo A-I obtenida de suero a) (Prieto ED, Ramella N, Cuellar LA, Tricerri MA, Garda HA. *Protein J*. 2012, en prensa (78). y b) Ryan RO, (79)). Esta construcción fue la que se usó en este trabajo para expresar la proteína salvaje, y como molde para generar las mutantes de cisteína K107C, K133C y K226C. Para generar los cDNA de estas mutantes de cisteína se utilizó PCR sobre el plásmido completo con PfuTurbo DNA polimerasa usando los siguientes pares de oligonucleótidos iniciadores:

Mutación K107C. Tm del primer = 77.7 °C

5´-C GAC TTC CAG AAG **AAG** TGG CAG GAG G-3´ Secuencia original

5´-C GAC TTC CAG AAG **TGT** TGG CAG GAG G-3´ Primer 1 (directo)

5´-C CTC CTG CCA **ACA** CTT CTG GAA GTC G-3´ Primer 2 (reverso)

Mutación K133C. Tm del primer = 84.0 °C

5´-GC GCG CGC CAG **AAG** CTG CAC GAG CTG-3´ Secuencia original

5´-GC GCG CGC CAG **TGT** CTG CAC GAG CTG-3´ Primer 1 (directo)

5´-CAG CTC GTG CAG **ACA** CTG GCG CGC GC-3´ (2)

Mutación K226C. Tm del primer = 87.1 °C

5´-G CCC GTG CTG GAG AGC TTC **AAG** GTC AGC TTC CTG-3´ Secuencia original

5´-G CCC GTG CTG GAG AGC TTC **TGT** GTC AGC TTC CTG-3´ Primer 1 (directo)

5´-CAG GAA GCT GAC **ACA** GAA GCT CTC CAG CAC GGG C-3´ Primer 2 (reverso)

Los productos de PCR fueron chequeados por electroforesis en gel de agarosa antes y después de ser tratados con la nucleasa Dpn1 que digiere el ADN molde cortando en secuencias GATC metiladas dejando intacto al ADN amplificado por PCR. La figura 25 a muestra los productos de las reacciones de PCR para las tres mutaciones. Controles en ausencia de cebadores (no mostrados) fueron negativos en la amplificación del plásmido.

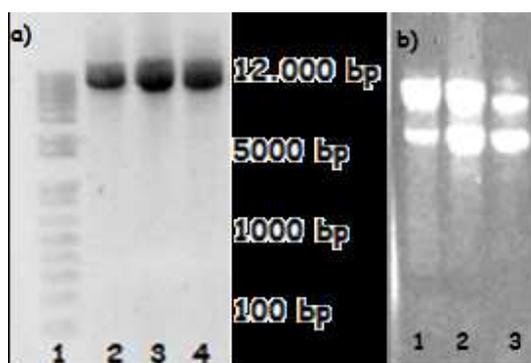


Figura 25. Geles de agarosa. a) Productos de PCR en presencia de los cebadores conteniendo las mutaciones, antes de ser digeridos con la enzima *dpn1*. Calle 1: Estándares de peso molecular. Calles 2, 3 y 4: mutaciones K107C, K133C y K266C, respectivamente. b) Preparaciones de plásmidos de bacterias JM109 transformadas con los productos de PCR correspondientes a las tres mutaciones.

Los productos de PCR digeridos con *Dpn1* se usaron para transformar bacterias competentes JM109. Estas se plaquearon en agar en presencia de kanamicina y se colectaron unas 4 o 5 colonias correspondientes a cada mutación. Cada colonia fue expandida y usada para preparar ADN plasmídico, el que fue enviado a secuenciar (Macrogen, Corea) entre los sitios S-tag y T7 terminator. La figura 25b muestra el gel de agarosa de tres de las preparaciones de plásmidos enviadas a secuenciar. Puede notarse que éstas contienen dos bandas. La de mayor migración electroforética corresponde al plásmido superenrollado intacto, mientras que la de menor migración se genera por cortes en una de las hebras (producidos durante el procedimiento de extracción) que le hacen perder el superenrollamiento. Los productos de PCR (figura 25a) tienen un corte en cada hebra por tanto no tienen superenrollamiento.

4.1.3. Expresión y purificación

Con las preparaciones plasmídicas de secuencia correcta (con la mutación deseada y sin ninguna mutación indeseada) se transformaron bacterias BL21, a las que se le realizó una prueba en mini-escala (en 4 ml de medio de cultivo), de expresión inducida por IPTG. La expresión de apo A-I y mutantes fue reconocida en análisis de SDS-PAGE por la aparición de una banda en la región de los 35 KD (correspondiente a la proteína de fusión) en los extractos de los cultivos inducidos por IPTG y ausente en aquellos no inducidos (ver Figura 26). Para cada tipo de mutación se seleccionó aquella colonia que presentaba mejor nivel de expresión. Esta fue fraccionada y almacenada en 20% glicerol a -80°C hasta su utilización para expresión en macro escala.

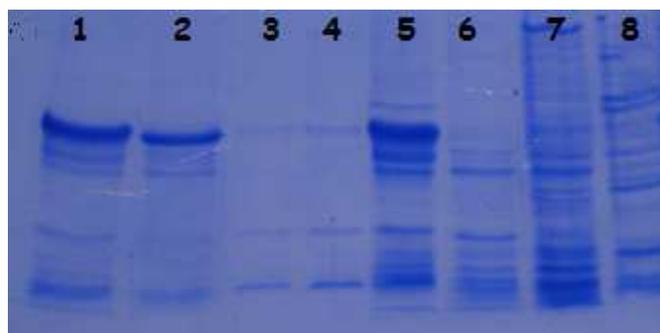


Figura 26. SDS-PAGE de los ensayos de expresión en mini escala. Calles 1, 2 y 5: Extractos de bacterias BL21 inducidas con IPTG. Calles 6, 7 y 9: Extractos de bacterias sin inducir con IPTG.

Curvas de crecimiento de las bacterias transformadas y pruebas de diferentes tiempos de inducción con IPTG se usaron para optimizar las condiciones de expresión. Para la expresión de las mutantes en macroescala, se utilizaron cultivos en 1 litro de medio crecidos hasta una DO de 0,6. Luego de inducir con IPTG se continuó la incubación por 2 horas y las bacterias se precipitaron por centrifugación. El precipitado de bacterias se trató con guanidina HCl 3,0 M y se volvió a centrifugar para eliminar membranas y restos celulares. El sobrenadante se dializó contra buffer fosfato 50 mM, NaCl 0,5 M pH 7,4; y se cargó en una columna de cromatografía de afinidad por metales (agarosa con sulfato de níquel). A las que las proteínas con cola de histidina se adsorben por afinidad. Las proteínas contaminantes no adsorbidas se lavan, primero con buffer

fosfato, luego con el mismo buffer con baja concentración de imidazol (0.05 M) y finalmente se eluyen las proteínas de interés mediante competencia con buffer conteniendo 0,5 M de imidazol. Se siguió la elución por Absorbancia a 280nm cada 2 ml de eluido y la pureza de éstos se controló por SDS-PAGE. La figura 27 muestra un perfil de elución típico durante los pasos de purificación, y la figura 28 la pureza de las preparaciones.

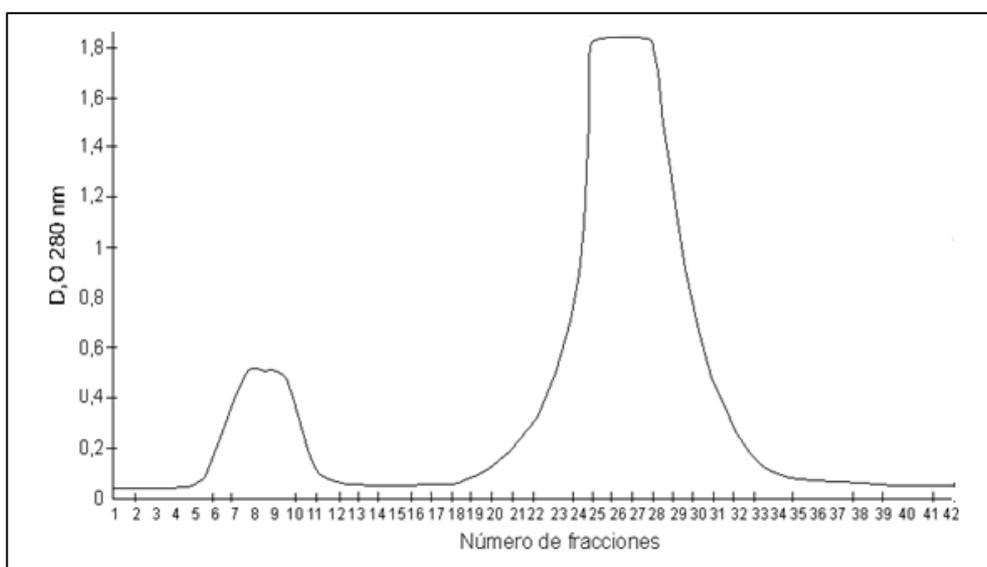


Figura 27. Proteína perfil de elución típico. El primer pico corresponde a las proteínas no adsorbidas y el segundo a las eluidas con 0,5 M imidazol. Calles c y e

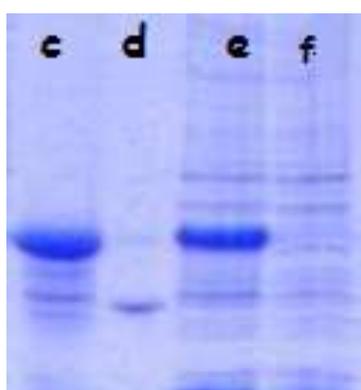


Figura 28. SDS-PAGE de las fracciones eluidas de las columnas de agarosa - NiSO₄. Calle d: estándar de apoA-I. Calle f: fracción no adsorbida (primer pico de la figura 27). Calles c y e: fracciones eluidas con 0,5 M imidazol (segundo pico de la figura 27).

4.1.4 Clivaje con ácido fórmico

Las proteínas de fusión purificadas por las columnas de Ni, fueron clivadas en presencia de ácido fórmico (50% v/v) a una temperatura de 45 grados centígrados durante 4 horas. Posteriormente, las proteínas fueron dializadas extensivamente (hasta neutralización del pH) frente a 50mM NaPO₄; 0,5 M NaCl; pH 7,4. La extensión del clivaje fue controlada por SDS-PAGE.

Luego del clivaje, las muestras fueron sometidas a una segunda cromatografía de afinidad por Niquel para eliminar el fragmento poli-His y restos de proteína de fusión que pudiera permanecer sin clivar. En este caso, algunas condiciones tuvieron que ser ajustadas para las mutantes de cisteína, ya que a diferencia de apoA1 salvaje que eluye en ausencia de imidazol, la elución de las mutantes de cisteína ocurre con 0,05 M de imidazol. En la figura 29 se muestran los controles de SDS-PAGE para las preparaciones finales de las tres mutantes de cisteína.

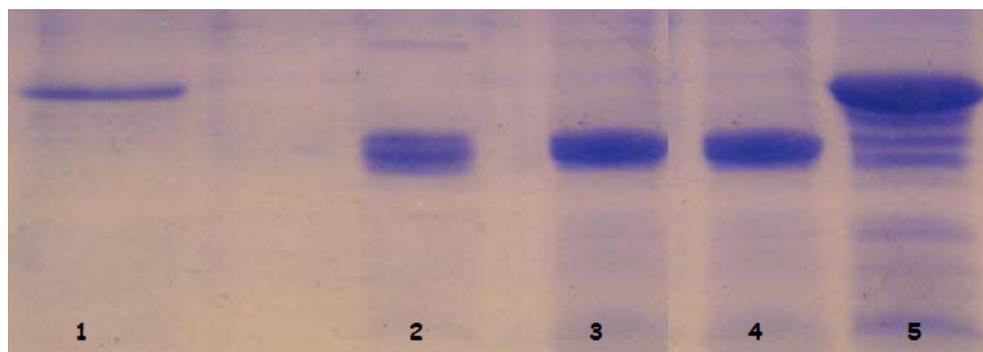


Figura 29. SDS-PAGE de las mutantes de cisteína luego del clivaje con ácido fórmico y segunda cromatografía en columnas de níquel. Calles 1 y 5: Apo A-I salvaje antes del clivaje con ácido fórmico. Calles 2, 3 y 4: Preparaciones finales de K107, K133C y K226C, respectivamente.

La concentración de las proteínas fue determinada de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 32.430 M⁻¹ cm⁻¹ para todas las proteínas (o 1,165 y 1,166 ml/mg para apoA-I salvaje o las mutantes de cisteína, respectivamente). El rendimiento final aproximado de las mutantes fue de 5 a 8 mg de proteína purificada por litro de medio de cultivo.

4.2. Caracterización estructural de apoA-I K107C, K133C y K226C.

ApoA-I contiene 4 residuos triptófano (trp) en distintas posiciones de la secuencia (8, 50, 72 y 108), que pueden usarse como sondas intrínsecas que informan sobre la conformación estructural de la proteína. Para chequear si los cambios introducidos en la secuencia de la proteína afectan su estructura, se realizaron una serie de determinaciones basadas en la fluorescencia de trp en las mutantes de cisteína en comparación con la proteína salvaje: a) espectro de emisión de trp, b) comportamiento frente a agentes desnaturizantes como guanidina-HCl, c) extinción de la fluorescencia de trp con acrilamida, y d) transferencia de energía desde trp a la sonda lipofílica ANS.

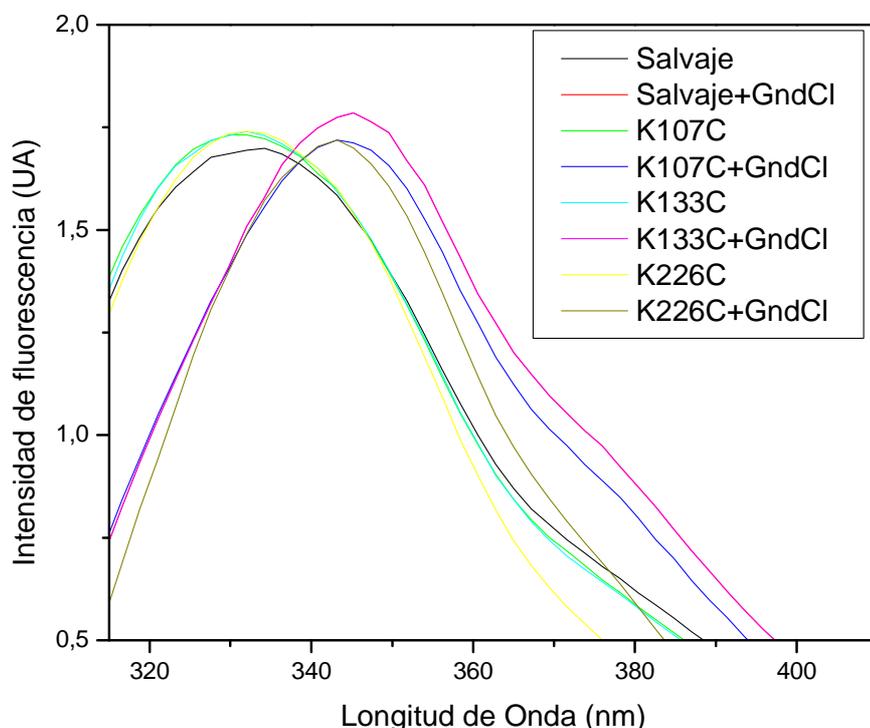


Figura 30. Espectro de fluorescencia de Apo A-I salvaje y mutantes K107C, K133C, K226C en buffer fosfato y en guanidina clorhídrica 3M. Los espectros se obtuvieron en un espectrofluorómetro SLM4800 a 25 °C con cubetas de paso óptico de 0.2 cm para excitación y 1 cm para la emisión. Se usó una concentración de proteína de 0.2 mg/ml en buffer fosfato 25 mM, pH=7.4, excitando a 295 nm y registrando el espectro de emisión entre 300 y 550 nm con slits de emisión y excitación de 8.

Curvas de desnaturalización fueron realizadas midiendo los espectros de emisión de trp de las proteínas (a 0,05 mg/ml) en presencia de concentraciones crecientes de guanidina-HCl. En la figura 31 se muestra el centro de masa del espectro en función de la concentración de guanidina-HCl para apo A-I sérica, la apoA-I recombinante tipo salvaje y las tres mutantes de cisteína.

En el estado libre de lípidos, se realizaron las medidas de fluorescencia en condiciones nativas y desnaturalizantes con Guanidina-HCl 3M, condición en la que se sabe que la proteína se encuentra completamente desplegada (78). El espectro de fluorescencia de Apo A-I en el estado nativo presenta un máximo de emisión centrado en 338-339 nm (ver tabla III-1). En el estado desplegado (con guanidina-HCl 3 M), observamos como la longitud de onda correspondiente al máximo en el espectro de emisión presenta un corrimiento al rojo de 20 nm tanto en la proteína salvaje como en cada uno de los mutantes (figura 30).

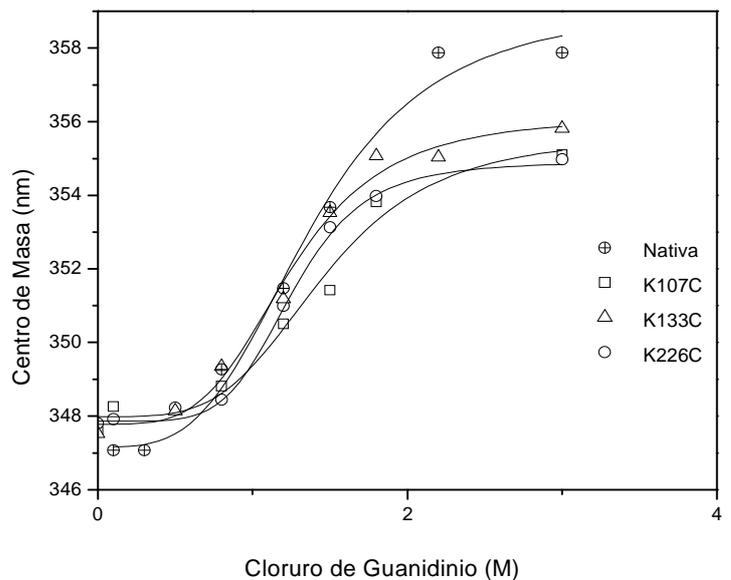
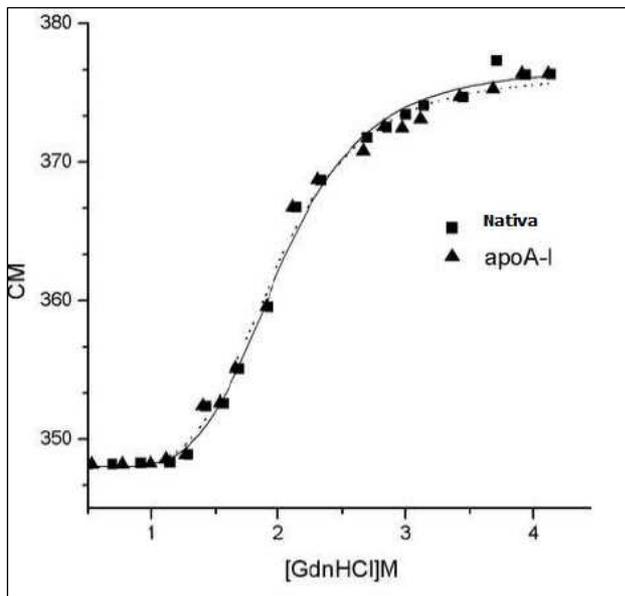


Figura 31. Curvas de desnaturalización con guanidina-HCl de apoA-I plasmática y apoA-I recombinante tipo salvaje (arriba), y mutantes K107C, K133C y K226C (debajo).

Suponiendo un proceso de sólo dos estados (plegado y desplegado), la energía libre del desplegamiento por guanidina-HCl (ΔG) estaría dada por (Gursky O et al, (81),(82)):

$$\Delta G = \Delta G_0 + M [GdnHCl] \quad [e1]$$

donde ΔG_0 es la energía libre de desplegamiento en ausencia de GdnHCl y el parámetro M depende de la exposición de los trp (y corrimiento espectral) en el

desplegamiento.

El grado de desplegamiento (αg) para cada $[GndHCl]$ puede derivarse de los datos espectrales (asumiendo $\alpha g=0$ para $[GndHCl] = 0$, y $\alpha g=1$ para $[GndHCl] = 3.0 M$), y la ecuación (1) puede expresarse como:

$$\ln [\alpha g/(1-\alpha g)] = \ln K_0 + M [GndHCl] / RT \quad [e2]$$

donde K_0 es la constante de equilibrio en ausencia de $GndHCl$, R es la constante de los gases y T la temperatura ($25^\circ C$). Así, gráficos lineales de $\ln [\alpha g/(1-\alpha g)]$ vs $[GndHCl]$ permiten calcular K_0 de la ordenada de origen, y por tanto ΔG_0 como:

$$\Delta G_0 = -RT \ln K_0 \quad [e3]$$

Los datos de ΔG_0 y M , así como la concentración de guanidina-HCl que resulta en 50% de desplegamiento son muy similares para las diferentes proteínas (ver tabla III-1), indicando que ni los reemplazos de lisinas por cisteínas ni la ausencia de los dos primeros residuos en el extremo N afectan a la estabilidad o al plegamiento de la proteína

	Plasma apoA-I	FWt	K107C	K133C	K226C
WMF (nm) ^f	337 ± 2	339 ± 2	339 ± 2	340 ± 2	339 ± 2
ΔG^0 (Kcal/mol) ^a	2.90 ± 0.2	2.90 ± 0.2	2.89 ± 0.2	2.91 ± 0.2	2.88 ± 0.2
M^b	1664 ± 100	1693 ± 100	1710 ± 100	1715 ± 100	1708 ± 100
$1/2[GndCl]^c$	1.48 ± 0.03	1.50 ± 0.04	1.52 ± 0.02	1.54 ± 0.04	1.53 ± 0.04
$K (M^{-1})^d$	5.57 ± 1.00	6.25 ± 1.10	6.26 ± 1.10	6.23 ± 1.10	6.30 ± 1.10
fa^e	0.78 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.79 ± 0.01
E^g	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01

Tabla III-1. Propiedades espectrales y estabilidad de ApoA-I plasmática, ApoA-I salvaje recombinante (FWt), y mutantes K107C, K133C y K226C.

Para tener información sobre el grado de exposición promedio al solvente de los residuos trp, los espectros de emisión de trp de las proteínas (0,2 mg/ml) fueron determinados en presencia de concentraciones crecientes (0 a 0,4 M) de acrilamida, un extinguidor hidrosoluble. Luego de corregir por la dilución y por filtro interno debido a la absorción de acrilamida, los datos de intensidad (ver figura 32) fueron analizados de acuerdo con la siguiente expresión modificada de la ecuación de Stern-Volmer (Lakowicz, J.R., 1999):

$$F_0 / \Delta F = F_0 / (F_0 - F) = 1 / (f_a K [Q]) + 1 / f_a \quad [e4]$$

donde F_0 es la fluorescencia inicial en ausencia de acrilamida, ΔF es la diferencia entre la fluorescencia inicial y luego del agregado de una determinada concentración de acrilamida $[Q]$, f_a es la fracción de la fluorescencia inicial que es accesible al quencher, y K es la constante de quenching de Stern-Volmer. Los datos de K y f_a obtenidos mediante el ajuste de la ecuación [e1] a los datos experimentales son informados en la tabla III-1. Tanto K como f_a son muy similares para las 3 mutantes de cisteína y apoA-I salvaje recombinante. Un valor de K algo menor fue determinado en el caso de la proteína sérica, aunque no es significativamente diferente del de apoA-I recombinante tipo salvaje o de los correspondientes a las mutantes de cisteína.

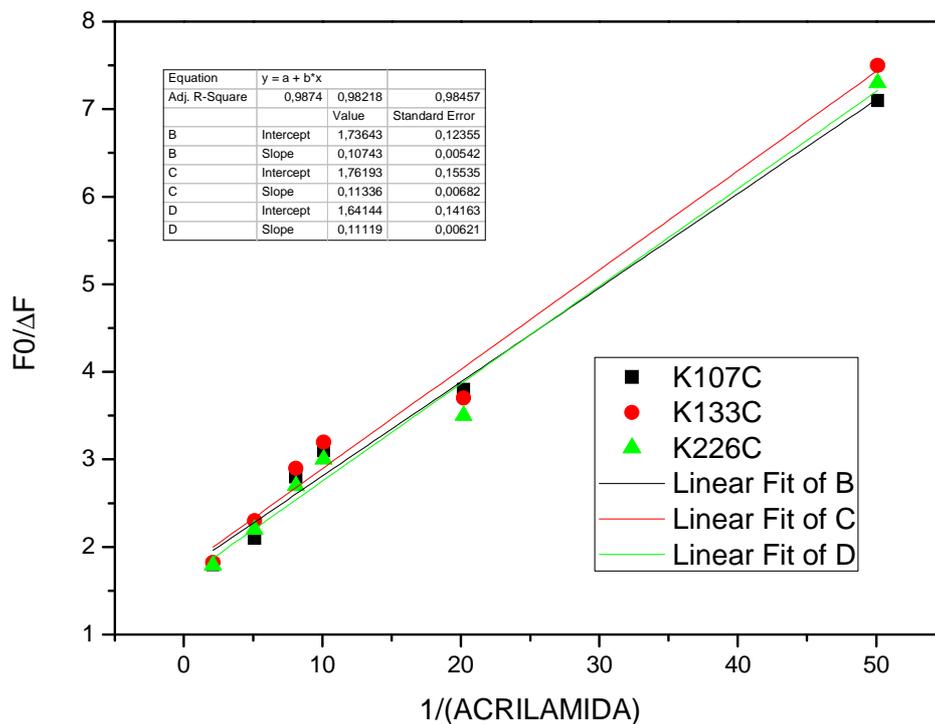


Figura 32. Extinción de la fluorescencia de triptófano por acrilamida en mutantes de cisteína.

Otra estrategia utilizada para determinar si las mutaciones introducen algún cambio estructural en la proteína, fue la medición de la eficiencia de transferencia de energía de resonancia (FRET) desde los trp hacia el aceptor lipofílico 4,4'-dianilino-1,1'-binaftil-5,5'-disulfonato (bis-ANS) exógenamente agregado. Los espectros de emisión de trp de las proteínas (a 0,1 mg/ml o 3,6 μM) fueron adquiridos entre 310 y 550 nm en ausencia y presencia de 7,2 μM de bis-ANS. La eficiencia de FRET (Et) fue estimada por la expresión:

$$Et = 1 - FDA / FD \quad [e5]$$

donde FD y FDA son las intensidades de emisión del donador (en este caso los trp) en ausencia y presencia del aceptor (bis-ANS), respectivamente.

Los valores de Et (ver tabla III-1) son muy similares entre todas las proteínas ensayadas. Como veremos más adelante, la eficiencia de FRET depende de la sexta potencia de la distancia entre el donador y el aceptor, siendo así extremadamente sensible a pequeños cambios en esa distancia. En este caso, la

eficiencia será un promedio de las que resultan del FRET desde los 4 trp de apoA-I al sitio (o los sitios) de unión del bis-ANS, por lo que podemos concluir que las mutaciones no generan cambios conformacionales que modifiquen esas distancias.

4.3 Marcación de las proteínas Mutantes

Se continuó con la marcación de cada una de las mutantes con las sondas Alexa 350, Alexa 488, Alexa 546, Alexa 647 y finalmente Tempo para realizar las mediciones de fluorescencia así como también las medidas de resonancia Paramagnética electrónica.

Se usaron derivados maleimilados de las sondas que reaccionan con el tiol de las cisteínas según la siguiente reacción:



Figura 33. Reacción de maleimidias con tioles para formar tioeteres.

Como se describió en Materiales y Métodos, la reacción se realizó en presencia de 3,0 M guanidina-HCl y TCEP para mantener las proteínas en estado desplegado y las cisteínas reducidas, con una relación molar de sonda/proteína de 5/1. Luego de 8 horas a 4°C, se agregó glutatión reducido (en una relación molar 10/1 respecto a la proteína) para detener la reacción. El exceso de sonda libre (o formando tioeter con glutatión) se eliminó por ultrafiltración usando concentradores Centricom de corte 10 kDa. El procedimiento de ultrafiltración (en el que el volumen de la mezcla de reacción se redujo al menos 10 veces), fue repetido en tres oportunidades luego de llevar la muestra al volumen original con 3 M guanidina-HCl. Los espectros de absorción de las proteínas marcadas fueron registrados en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Helios b Thermo Scientific, Waltham, MA), antes y después de eliminar la guanidina-HCl por diálisis contra 0,25 M buffer fosfato. Las figuras 34 y 35 muestran los espectros de absorción de las proteínas marcadas con Alexa-350, -488, -546 y -647.

El grado de marcación se determinó de acuerdo con la siguiente expresión:

Eficiencia de marcado= [sonda]/[proteína]

$$[\text{sonda}] = A^{\text{máx}}_{\text{PS}} / \epsilon_{\text{sonda}} \quad [\text{proteína}] = \frac{A^{280} - A^{\text{máx}}_{\text{PS}} \times C_f}{\epsilon_{280 \text{ prot}}} \quad [\text{e6}]$$

donde $A^{\text{máx}}_{\text{PS}}$ es la absorbancia de la muestra en la longitud de onda del máximo del pico de absorción de la sonda; ϵ_{sonda} es el coeficiente de extinción (en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) para cada una de las sondas en su máximo de absorción (valores indicados para cada sonda en la tabla III-2); A^{280} es la absorbancia de la muestra a 280 nm; $\epsilon_{280 \text{ prot}}$ es el coeficiente de absorción de la proteína a 280 nm (se usó el valor de $34.200 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para apoA-I); mientras que C_f es la relación de la absorción (o coeficiente de extinción) para la sonda libre entre 280 nm y la longitud de onda del máximo del pico de absorción. Los valores de C_f usados fueron: 0,19 para Alexa-350; 0,11 para Alexa-488; 0,12 para Alexa-546; y 0,03 para Alexa 647 (obtenidos de los manuales de cada sonda provistos por Molecular Probes). El mayor inconveniente en estas determinaciones es la incerteza en las determinaciones de absorbancia a 280 nm que es muy afectada por el grado de turbidez de las muestras, cuya interferencia es aún más importante luego de reconstituir dHDL (ver debajo). Así, para una determinación más precisa de la concentración de proteína se usó alternativamente la segunda derivada del espectro en la región de 260-320 nm usando apoA-I salvaje de concentración conocida como estándar. La diferencia entre el mínimo a 282 nm y el máximo a 286 nm (ver figura 36) fue usada como parámetro independiente del grado de turbidez para estimar la concentración proteica. En todos los casos, el grado de marcación estuvo dentro del rango de 0,8 a 1,1. Usando el mismo procedimiento de marcación con apoA-I tipo salvaje (que carece de cisteínas) se determinó que la marcación inespecífica fue menor del 5%.

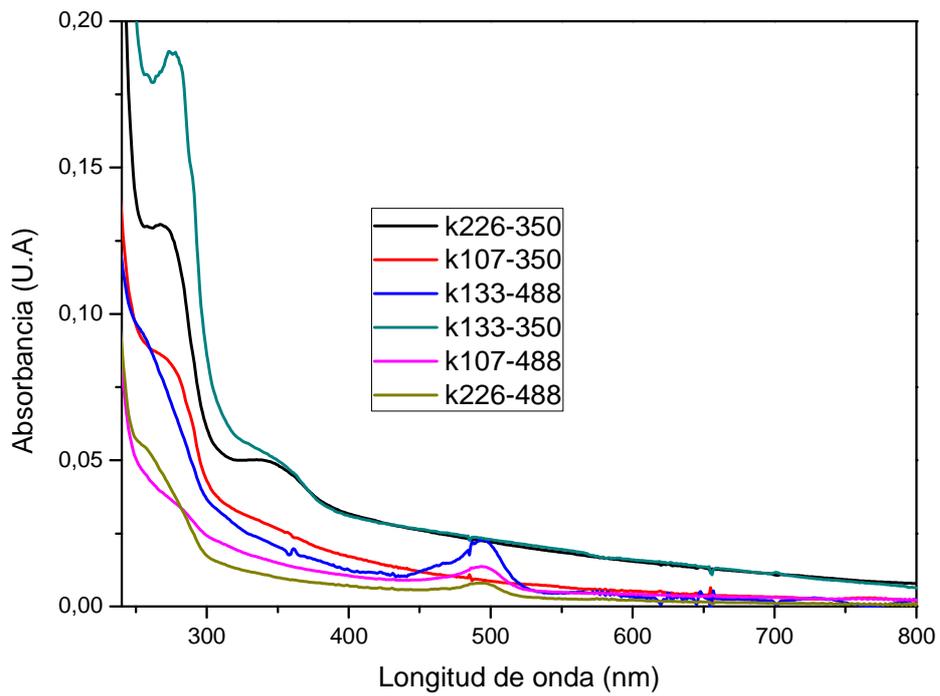


Figura 34. Espectros de absorbancias de cada una de las mutantes marcadas con Alexa 350 y Alexa 488.

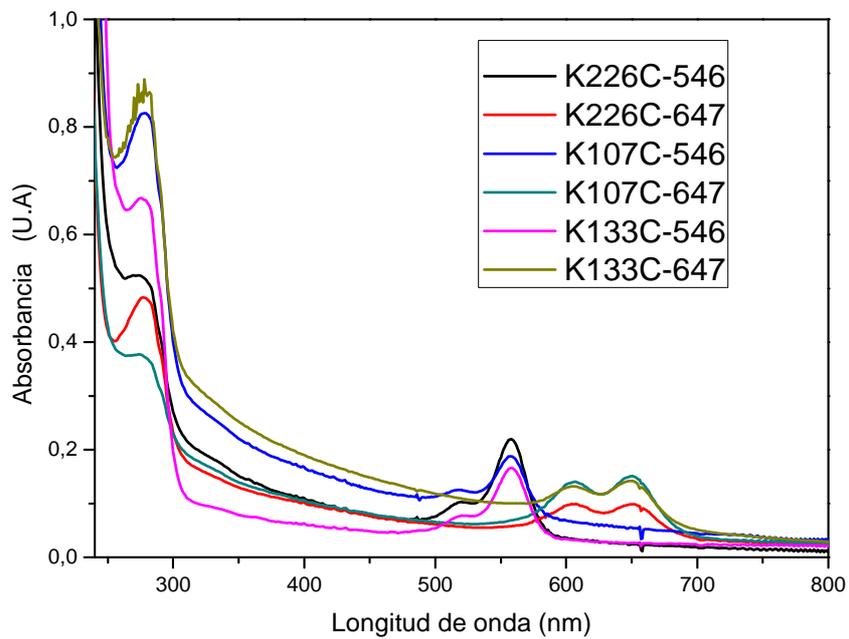


Figura 35. Espectros de absorbancias de cada una de las mutantes marcadas con Alexa 546 y Alexa 647.

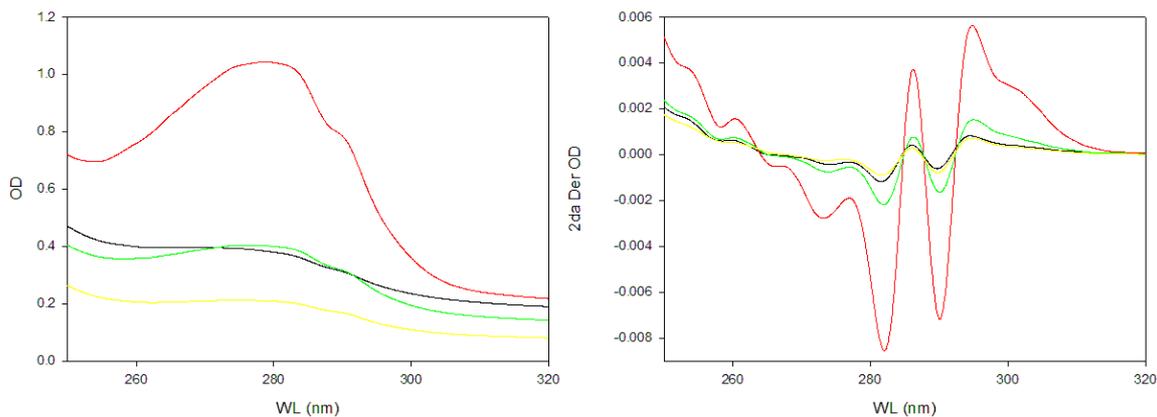


Figura 36. Espectros de absorción (izquierda) y segunda derivada de los mismos (derecha) correspondientes a diferentes muestras de apoA-I con distintos niveles de turbidez.

4. 4. Caracterización estructural y funcional de las proteínas marcadas

4.4.1. Espectros de emisión de triptófano

Los espectros de emisión de triptófano (excitación a 290 nm) de las mutantes marcadas con cada una de las sondas, fueron medidas en presencia y ausencia de Guanidina-HCl 3,0 M y comparados con los de Apo A-I tipo salvaje. En ningún caso se detectó un corrimiento espectral que indicara alguna modificación del entorno de los trp, lo que indica que la unión de las sondas a la proteína no interfiere con el correcto plegado de la proteína en el estado libre de lípidos. En algunos casos (en especial con la mutante K107C marcada con Alexa-350) se detectó una disminución en la intensidad de emisión de trp, que no desaparece en presencia de guanidina-HCl, lo que puede ser atribuido a transferencia de energía desde un trp espacialmente cercano a la sonda (como trp108).

Como ejemplo, en la figura 37 se muestran los espectros de emisión de trp (excitación a 290 nm) para las mutantes de cisteína marcadas con Alexa-488. Puede verse que la excitación a 290 nm también resulta en la emisión de Alexa-488 en la región de 520 nm, lo que se debe en parte a excitación directa (ya que la sonda absorbe a 290 nm) y en parte a transferencia de energía desde trp. La figura 37 también muestra los espectros de emisión de la sonda por excitación a 490 nm. Los espectros (y sus intensidades relativas a la absorción o rendimiento cuántico) fueron independientes del sitio de marcación.

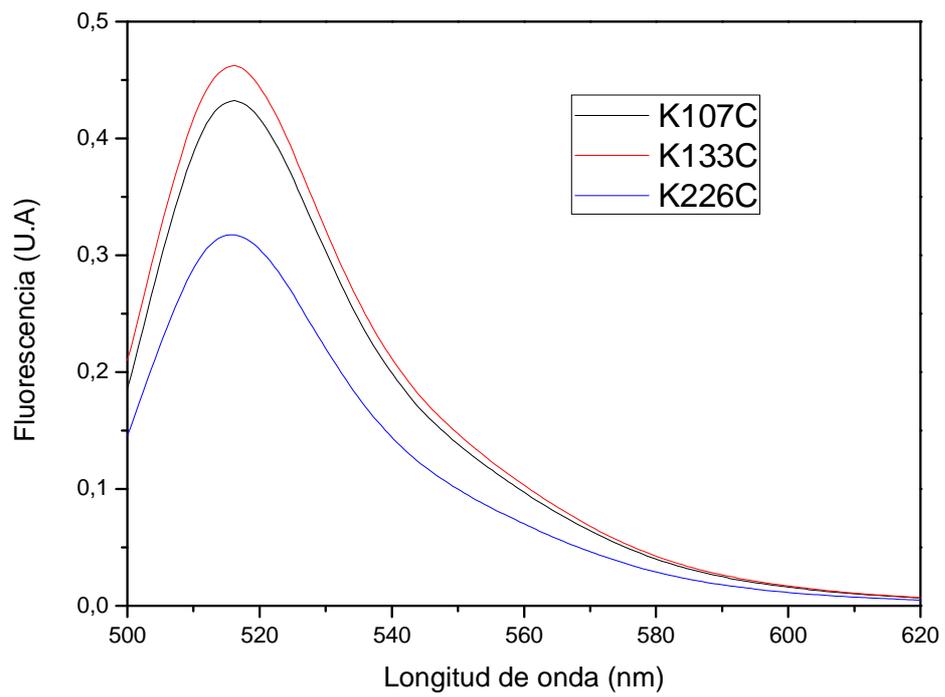
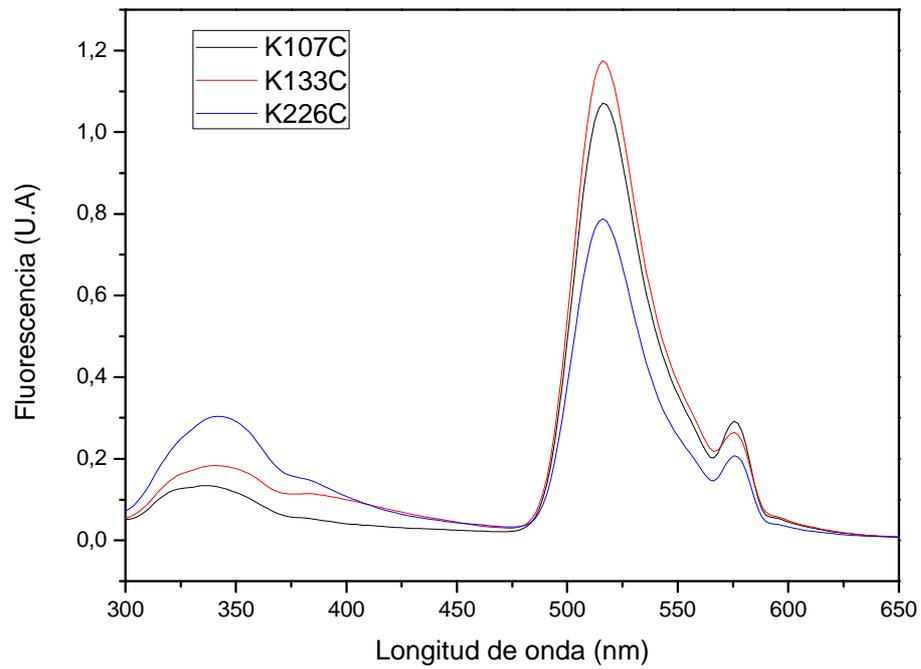


Figura 37. Espectros de emisión de las mutantes marcadas con A-488 excitando a 290 nm (arriba) o a 490 nm (debajo).

4.4.2 Capacidad de Apo A-I salvaje y las mutantes marcadas o no marcadas para formar complejos lipoproteicos

La interacción de ApoA-I con vesículas compuestas de DMPC en el rango de temperatura de la transición de fase gel/líquido-cristalino (T_m DMPC 24°C) resulta en la rápida interrupción de las vesículas y la generación de dHDL. Esta reacción de micelización es fácil de seguir por la disminución de turbidez. Se investigó la capacidad de cada una de las mutantes comparativamente con apoA salvaje para micelizar liposomas multilamelares de DMPC a 24°C siguiendo el cambio de densidad óptica a 350 nm. La figura 38 muestra que las tres mutantes de cisteína (ya sea marcadas o no con Alexa-488) presentan curvas de micelización muy similares a la apoA-I tipo salvaje.

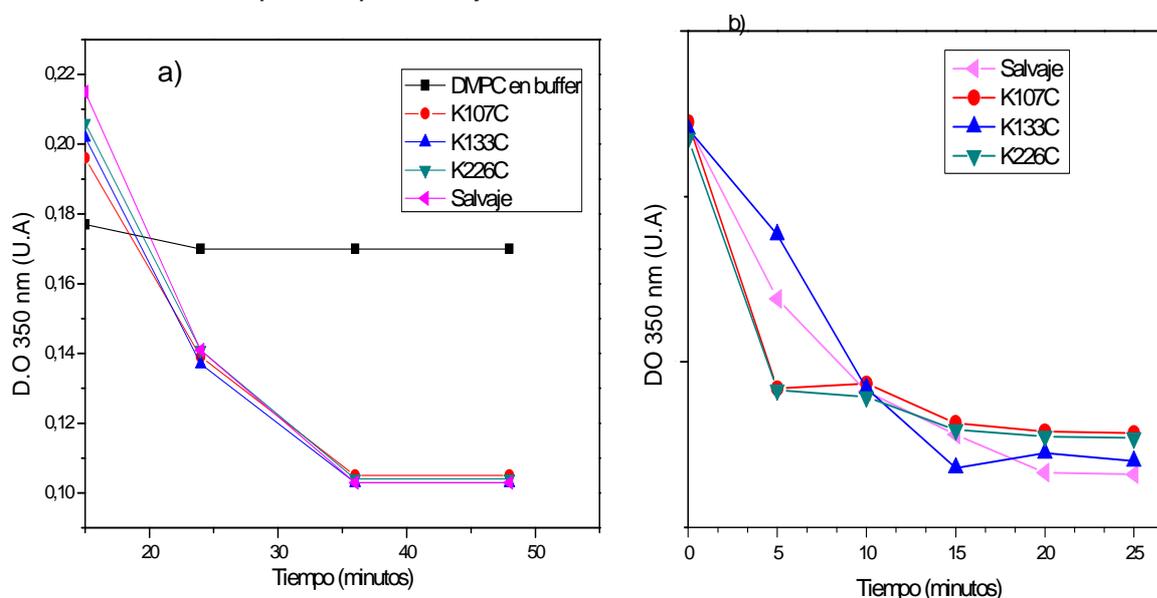


Figura 38. a) micelización de vesículas de DMPC por Apo Salvaje y Apo mutadas sin marcar. b) Lipidación espontanea proteínas mutantes marcadas con alexa 488. Las concentraciones de proteína y DMPC fueron de 0,2 mg/ml, lo que corresponde a una relación molar de 1/40.

Los productos de micelización fueron analizados por electroforesis en gels de poliacrilamida en gradiente en condiciones no desnaturizantes (PAGGE). El gel de la izquierda de la figura 39 muestra que los complejos lipoproteicos formados por la reacción de micelización son heterogéneos en tamaño. Sin embargo, si las muestras son sometidas a varios ciclos de temperatura pasando por la transición

de fase (aquí se usaron 5 ciclos entre 4 y 34° manteniendo a las muestras 1 hora a cada temperatura), se genera una población homogénea de complejos lipoproteicos con un tamaño de aproximadamente 140 kD o 10 nm de diámetro de Stokes (figura 39, gel de la derecha).

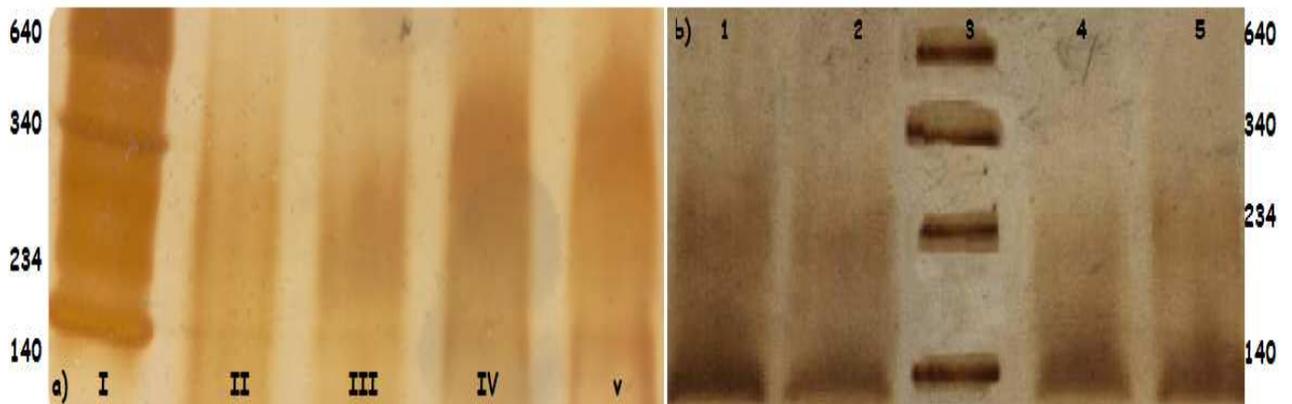


Figura 39. Complejos dHDL generados por la reacción de apoA-I salvaje con vesículas de DMPC a la Tt (24°C). El gel de la izquierda muestra los complejos formados directamente en la reacción a 24°C, mientras que el gel de la derecha corresponde a las mismas muestras luego de ser sometidas a 5 ciclos de temperatura entre 4 y 34° manteniendo a las muestras 1 hora a cada temperatura. En el gel de la izquierda la calle I corresponde a marcadores de peso molecular; y las calles II, III, IV y V corresponden a los productos formados por K107C, K133C, K226C y apoA-I salvaje, respectivamente. En el gel de la derecha las calles 1, 2, 4 y 5 corresponden a los complejos dHDL de K107C, K133C, K226C y apoA-I salvaje respectivamente; y la calle 3 a marcadores de peso molecular.

En otros experimentos (no mostrados) se determinó que apoA-I recombinante salvaje y apoA-I sérica micelizan vesículas de DMPC a una velocidad similar, generando productos dHDL de tamaño similar: 10 nm de diámetro de Stokes para la misma relación de lípido/proteína de partida que se usó aquí (Prieto ED, Ramella N, Cuellar LA, Tricerri MA, Garda HA. Protein J. 2012, en prensa).

Complejos dHDL de las mutantes de cisteína y la proteína salvaje fueron también reconstituídos por el método de diálisis de micelas mixtas de apoA-//DMPC/colato (ver Materiales y Métodos). Partiendo de la misma relación de proteína/DMPC, por este método también se obtuvo inicialmente una mezcla heterogénea de partículas

lipoproteicas, que luego de la aplicación de los ciclos de temperatura se homogeneizó en un tamaño de 140 kDa o 10 nm de diámetro de Stokes (figura 40).

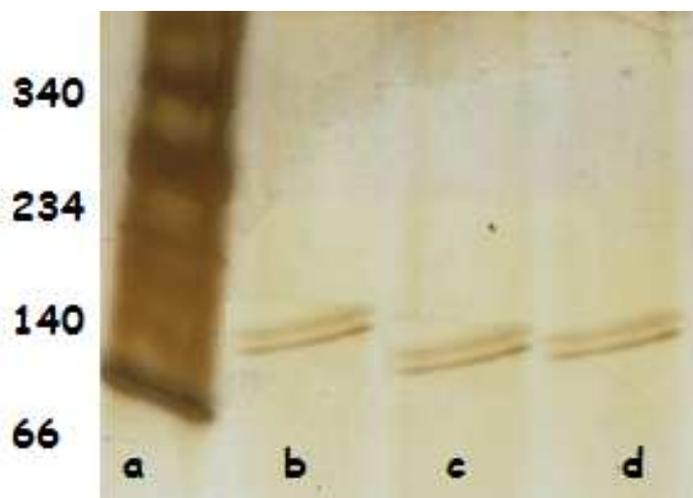


Figura 40. Gel nativo en gradiente de 4-16% de dHDL generadas por diálisis con colato y sometidas a 5 ciclos de temperatura como en la figura 39, para las mutantes de apoA-I K107C (calle b), K133C (calle c) y K226C (calle d). La calle a corresponde a estándares de peso molecular.

Así, estos resultados indican que las mutaciones introducidas en apoAI no afectan su capacidad de combinarse con DMPC ya sea por la reacción directa o por diálisis con colato. Por ambos métodos pueden obtenerse dHDL de tamaño similar luego de someter las muestras a ciclos de temperatura por encima y debajo de T_t . Considerando que estos complejos contienen 2 moléculas de apoAI y que su tamaño es de unos 140 kd, se puede estimar que contienen alrededor de 120 moléculas de DMPC.

4.5. Determinación de distancias intermoleculares por transferencia de energía de resonancia (FRET) en dHDL diméricas.

Antes de describir los resultados de estas determinaciones, es importante detallar las consideraciones teóricas sobre los fenómenos de FRET así como las particularidades del mismo en el sistema en estudio (las dHDL diméricas) que fueron tenidos en cuenta para la estimación de las distancias intermoleculares.

4.5.1. FRET entre fluoróforos idénticos (homo-FRET) o diferentes (hetero-FRET).

En el fenómeno de FRET, un fluoróforo donador (D) en su estado excitado le transfiere su energía a un cromóforo aceptor (A) a través de un acoplamiento no radiativo entre dipolos. La eficiencia de este proceso (E_t) depende de la sexta potencia de la distancia entre el donador y aceptor (R), siendo extremadamente sensible a pequeñas variaciones en torno a la distancia crítica R_0 (denominada distancia de Förster) que se calcula de las propiedades del fluoróforo como se indica más adelante y corresponde a aquella distancia que resulta en una eficiencia de FRET del 50%.

$$E_t = 1/(1+(R/R_0)^6) \quad [e7]$$

FRET puede ocurrir entre fluoróforos diferentes (hetero-FRET) o entre fluoróforos idénticos (homo-FRET). En el primer caso, el proceso resulta en una disminución en el rendimiento cuántico (Q) o intensidad (F) y el tiempo de vida (τ) de la emisión del fluoróforo donador (D), lo que es normalmente utilizado para estimar su eficiencia (E_t) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E_t = 1 - (Q_{DA}/Q_D) = 1 - (F_{DA}/F_D) = 1 - (\tau_{DA}/\tau_D) \quad [e8]$$

donde los subíndices $_{DA}$ y $_D$ se refieren al donador en presencia y ausencia del aceptor, respectivamente.

Combinando [e7] y [e8], resulta la siguiente expresión que es usada para estimar la distancia entre donador y aceptor (R) de la disminución en intensidad o tiempo de vida de fluorescencia:

$$\begin{aligned} R &= R_0 [Q_{DA}/(Q_D - Q_{DA})]^{1/6} = R_0 [F_{DA}/(F_D - F_{DA})]^{1/6} \\ &= R_0 [\tau_{DA}/(\tau_D - \tau_{DA})]^{1/6} \end{aligned} \quad [e9]$$

En el caso de homo-FRET, en cambio, el proceso no modifica ni el rendimiento cuántico ni el tiempo de vida de la emisión. Sin embargo, homo-FRET conduce a una depolarización de la emisión o disminución en la anisotropía, lo que permite estimar su eficiencia. Dos expresiones aproximadas, que conducen a resultados muy similares, han sido derivadas para estimar la distancia promedio (R) entre un par de fluoróforos idénticos sufriendo homo-FRET (83, 84,85)

$$R = R_0 [0,5 \times (2 r_2 - r_1) / (r_1 - r_2)]^{1/6} \quad [e10]$$

$$R = R_0 [(2 r_2 - r_1) / (r_1 - r_2)]^{1/6} \quad [e11]$$

donde r_1 y r_2 son las anisotropías en ausencia y presencia de homo-FRET, respectivamente.

4.5.2. El fenómeno de autoextinción de la fluorescencia.

Si bien en un proceso puro de homo-FRET no resultan afectados ni el rendimiento cuántico ni el tiempo de vida de la emisión, cuando la distancia involucrada es muy corta que permite la colisión o contacto, con algunos grupos fluorescentes puede ocurrir un fenómeno de autoextinción o autoapagado de la fluorescencia debido a la formación de complejos oscuros o no fluorescentes entre dos moléculas del fluoróforo. La eficiencia de este proceso depende mucho de la geometría y otras propiedades del grupo fluorescente y puede o no afectar al tiempo de vida de la fluorescencia (dependiendo de si el proceso es estático o dinámico). En cualquier caso, sin embargo, esto conducirá invariablemente a una disminución en la intensidad de la emisión que permite detectar su existencia y estimar su eficiencia. La ocurrencia de este fenómeno indica que los fluoróforos están lo suficientemente cercanos entre sí para permitir la colisión y/o formación del complejo oscuro, por lo que su detección puede por sí mismo informar sobre la cercanía entre las moléculas de fluoróforo. La ausencia de autoextinción, por el contrario, no indica necesariamente que los grupos fluorescentes estén entre sí alejados o fuera de la distancia de contacto, ya que no pueden descartarse cuestiones estéricas u orientacionales que impidan la formación del complejo oscuro. Así, el valor informativo de este fenómeno es relativo, pero su cuantificación es de gran importancia para la correcta interpretación y cuantificación de las eficiencias de FRET, como veremos debajo.

4.5.3. Estimación de la eficiencia de autoextinción en dHDL diméricas.

Como se mencionó, las dHDL utilizadas en este trabajo contienen 2 moléculas de apoA1 por disco. Denominando M a la proteína marcada y N a la no marcada, la eficiencia del proceso de autoextinción (E_a) podría estimarse si conociéramos la

relación entre los rendimientos cuánticos o intensidades de fluorescencia específicas para las dHDL que contienen dos moléculas M (MM) en relación a las dHDL conteniendo una molécula M y otra N (MN), de acuerdo con:

$$E_a = 1 - (Q_{MM} / Q_{MN}) \quad [e12]$$

donde Q_{MM} y Q_{MN} son los rendimientos cuanticos (o intensidades de fluorescencia específica por unidad de concentración) para MM y MN, respectivamente.

Los discos MM pueden ser obtenidas en estado homogéneo usando sólo M en su reconstitución. Por el contrario, es imposible obtener discos MN en estado homogéneo. Si para la reconstitución se usa una mezcla de M y N, se obtendrá una mezcla de discos con las tres combinaciones posibles (MM, MN y NN) cuya distribución seguirá una ley binomial. Considerando que no existe interacción preferencial entre las especies de proteína, al usarse para la reconstitución mezclas con diferentes proporciones de M y N, la distribución entre los diferentes discos será:

$$f_{MM} = f_M^2, \quad f_{MN} = 2 f_M f_N = 2 f_M (1-f_M), \quad \text{y} \quad f_{NN} = f_N^2 = (1-f_M)^2 \quad [e13]$$

donde f_{MM} , f_{MN} y f_{NN} son las fracciones molares de los discos MM, MN y NN resultantes; mientras que f_M y f_N son las fracciones molares de M y N en la mezcla inicial. En el caso de partir de una mezcla equimolar de M y N, la distribución esperada será 25% de MM, 50% de MN y 25% de NN. Esta distribución debe tenerse en cuenta tanto para estimar las eficiencias de autoextinción como de FRET.

Ya que la especie NN no es fluorescente, y MM contiene el doble de grupos fluorescentes que MN, la intensidad de fluorescencia total (F_t) de una preparación de dHDL reconstituída con una mezcla de M y N sera:

$$F_t = 2 (f_{MM} Q_{MM} + f_{MN} Q_{MN}) [P_T] = 2 (f_M^2 Q_{MM} + f_M (1-f_M) Q_{MN}) [P_T] \quad [e14]$$

donde $[P_T] = [M] + [N]$, es la concentración total de la proteína en la muestra.

El factor 2 puede ser ignorado por tratarse de intensidades relativas. Además, si la fluorescencia se expresa normalizada (F_n) por la concentración de la proteína marcada $[M] = f_M [P_T]$,

$$F_n = F_t/[M] = f_M Q_{MM} + (1-f_M) Q_{MN} = Q_{MN} + f_M (Q_{MM}-Q_{MN}) \quad [e15]$$

Dividiendo además por Q_{MM} , se obtiene la siguiente función que permite obtener la relación entre los rendimientos cuánticos en ausencia y presencia de autoextinción (Q_{MN}/Q_{MM}) directamente de la ordenada de origen de gráficos de F_n/Q_{MM} versus f_M :

$$F_n/Q_{MM} = f_M (1-Q_{MN}/Q_{MM}) + Q_{MN}/Q_{MM} \quad [e16]$$

Una vez obtenido el valor de la ordenada de origen (or), la eficiencia de autoextinción E_a puede ser calculada de la expresión equivalente a [e12]:

$$E_a = 1-(1/or) \quad [e17]$$

4.5.4. Influencia de la autoextinción y la distribución binomial en mediciones de homo-FRET

Para estimar la eficiencia de homo-FRET es necesario medir la anisotropía de fluorescencia en ausencia y presencia del fenómeno (r_1 y r_2 en [e10] y [e11]). En el caso de las dHDL, r_2 corresponde a la anisotropía de discos MM (r_{MM}) y r_1 a discos MN. Mientras que r_{MM} puede medirse directamente en discos reconstituídos sólo con M, r_{MN} tendrá que ser calculada indirectamente de medidas en dHDL preparadas con diferentes relaciones de M y N.

Por su propiedad aditiva, la anisotropía total (r_t) de una muestra con una determinada fracción molar de M será:

$$r_t = (f_M Q_{MM} r_{MM} + (1-f_M) Q_{MN} r_{MN}) / (f_M Q_{MM} + (1-f_M) Q_{MN}) \quad [e18]$$

En ausencia de autoextinción, Q_{MM} es igual a Q_{MN} , y esta ecuación se simplifica a:

$$r_t = r_{MN} + f_M (r_{MM} - r_{MN}) \quad [e19]$$

En presencia de autoextinción con eficiencia E_a , Q_{MM} en [e18] puede ser reemplazado por su equivalente $(1-E_a) Q_{MN}$ (ver [e12]):

$$r_t = (f_M (1-E_a) r_{MM} + (1-f_M) r_{MN}) / (1-f_M E_a) \quad [e20]$$

Multiplicando por $(1-f_M E_a)$ y reordenando:

$$r_t (1-f_M E_a) = r_{MN} + f_M ((1-E_a) r_{MM} - r_{MN}) \quad [e21]$$

Estimando E_a de las medidas de intensidad de fluorescencia, puede graficarse $r_t(1-f_M E_a)$ en función de f_M para obtener r_{MN} en la ordenada de origen, mientras que el valor de la pendiente será $(1-E_a) r_{MM} - r_{MN}$.

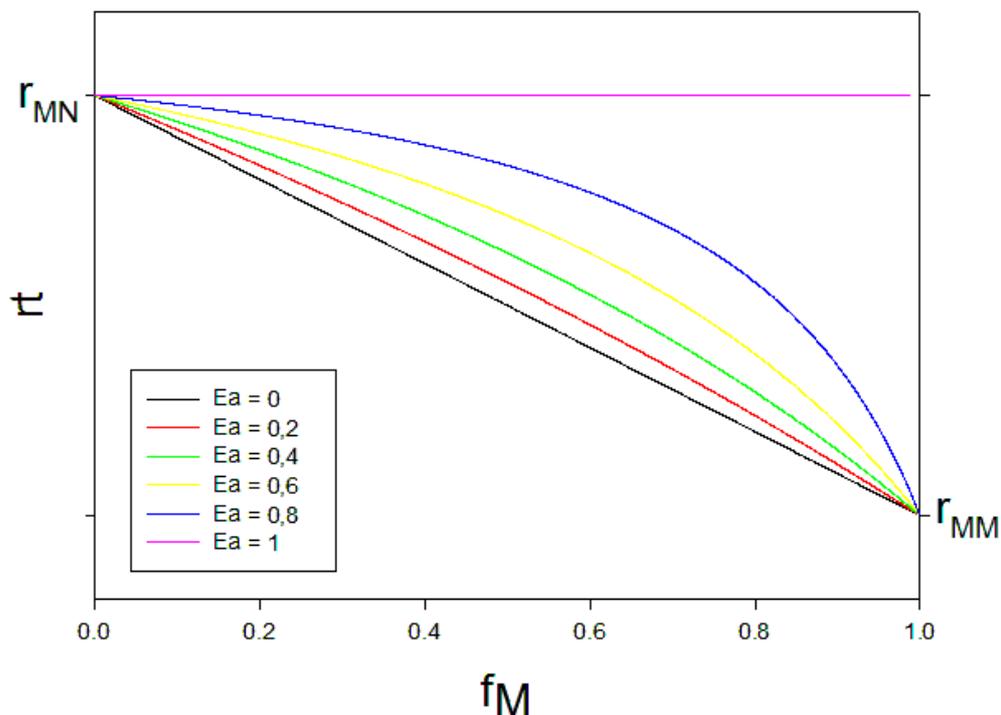


Figura 41. Curvas teóricas de anisotropía total (r_t) en función de la fracción molar de proteína marcada (f_M) para diferentes eficiencias de autoextinción.

La figura 41 ilustra la influencia de la autoextinción sobre las curvas de r_t en función de f_M . Puede verse que si E_a es menor del 20%, la influencia de la autoextinción es baja y puede ser despreciada. Pero para mayores valores de E_a , el error en la estimación de r_{MN} puede ser considerable si la misma no es considerada. En el caso extremo de que la eficiencia de autoextinción sea del 100%, sólo se observaría la emisión y anisotropía de los discos MN, ya que los MM serán totalmente oscuros.

4.5.5. Influencia de la autoextinción y la distribución binomial en mediciones de hetero-FRET

La eficiencia hetero-FRET puede estimarse de la intensidad de emisión de muestras de dHDL reconstituídas con una mezcla de la proteína marcada con un fluoróforo donador (D) y la marcada con un aceptor (A), en comparación con la intensidad de muestras preparadas con mezclas de D con la proteína no marcada

N. Para dHDL preparadas con una relación equimolar de D y A, la intensidad de fluorescencia total (F_{tDA}) será:

$$F_{tDA} = 0.5 Q_{DD} + 0.5 Q_{DA} \quad [e22]$$

donde Q_{DD} es el rendimiento cuántico o intensidad de emisión específica de discos conteniendo dos moléculas de apoAI marcadas con el grupo donador (DD); mientras que Q_{DA} es el rendimiento cuántico de discos conteniendo una molécula marcadas con aceptor y otra con aceptor (DA).

Similarmente, la fluorescencia total (F_{tDN}) de dHDL preparadas con una mezcla 1/1 de D y la proteína no marcada N, será:

$$F_{tDN} = 0.5 Q_{DD} + 0.5 Q_{DN} \quad [e23]$$

Si en el cálculo de eficiencia de FRET se utilizan directamente estos valores se obtendrá un valor aparente Et_{ap} .

$$\begin{aligned} Et_{ap} &= 1 - (F_{tDA}/F_{tDN}) = 1 - ((Q_{DD}+Q_{DA})/(Q_{DD}+Q_{DN})) \\ &= (Q_{DN}-Q_{DA})/(Q_{DD}+Q_{DN}) \end{aligned} \quad [e24]$$

La eficiencia real de FRET (Et), sin embargo, estará dada por $Et = 1 - (Q_{DA}/Q_{DN})$, mientras que la eficiencia de autoextinción (definida arriba) será $Ea = 1 - (Q_{DD}/Q_{DN})$. Despejando $Q_{DA}=Q_{DN} (1-Et)$ y $Q_{DD}=Q_{DN} (1-Ea)$, y reemplazándolos en la ecuación de arriba, tendremos que:

$$Et_{ap} = Et/(2-Ea) \quad \text{ó} \quad Et = Et_{ap} (2-Ea) \quad [e25]$$

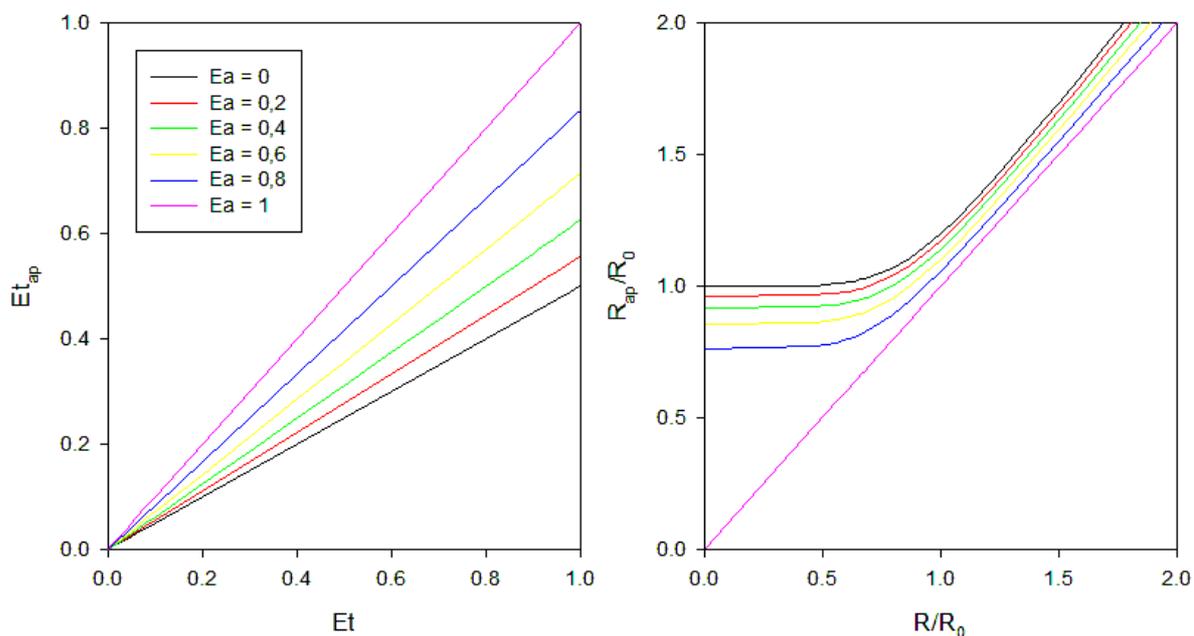


Figura 42. Influencia de la distribución binomial y la autoextinción sobre las estimaciones de distancias por hétero-FRET. Izquierda: Relación entre la eficiencia de FRET aparente ($E_{t_{ap}}$) y la real (E_t) para diferentes eficiencias de autoextinción (E_a). Derecha: Relación entre la distancia aparente (R_{ap}) y la real (R), expresadas como relativas a R_0 , para los mismos valores de E_a de la figura de la izquierda.

La figura 42 ilustra la relación entre $E_{t_{ap}}$ y E_t para diferentes valores de E_a . Es de notar que en ausencia de autoextinción, la eficiencia de FRET aparente es la mitad de la real. Esto es debido a que FRET ocurrirá solo en el 50% de las dHDL de la muestra. Cuando la autoextinción es máxima, en cambio, la eficiencia aparente de FRET coincide con la real, lo que es debido a que en este caso los discos DD son totalmente oscuros y la fluorescencia proviene sólo de DA o DN. También se grafica la distancia aparente (como R_{ap}/R_0) en función de la real (R/R_0) para ilustrar la magnitud del error que se cometería en el cálculo de las distancias si se usara directamente $E_{t_{ap}}$ con este fin.

4.5.6. Estimación de las distancias de Förster (R_0)

Los valores de R_0 para los diferentes pares donor/aceptor fueron determinados usando la siguiente ecuación:

$$R_0 = 0,211 [\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{1/6} \quad [e26]$$

Donde: n es el índice de refracción del medio asumido igual a 1,4. Q_D es el rendimiento cuántico del donor. κ es un factor orientacional que es igual a 2/3 para una orientación al azar, lo que fue asumido aquí. Esta suposición es justificada por los bajos valores de anisotropía de fluorescencia que se determinaron (ver debajo), que indican una alta movilidad y libertad rotacional de los fluoróforos unidos a la proteína. $J(\lambda)$ es el solapamiento espectral entre la banda de emisión del donor y la banda de absorción del aceptor, y fue calculado como:

$$J(\lambda) = \int f_{D(\lambda)} \varepsilon_{A(\lambda)} \lambda^4 d\lambda \quad [e27]$$

donde $f_{D(\lambda)}$ es el espectro de emisión del donor con área normalizada a la unidad, $\varepsilon_{A(\lambda)}$ es el espectro de absorción del aceptor a concentración 1 M y λ es la longitud de onda de onda

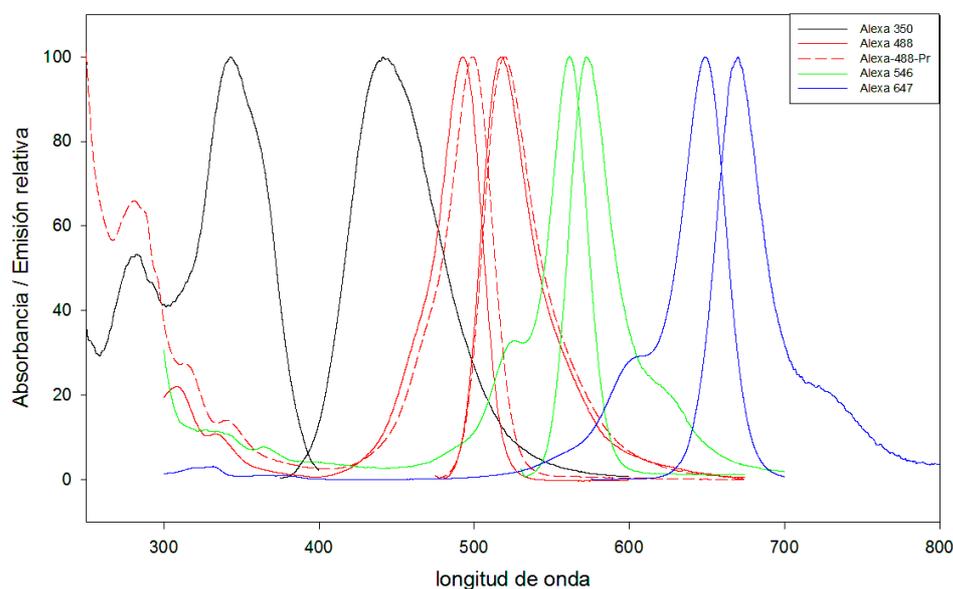


Figura 43. Espectros de absorción y emisión normalizados para diferentes fluoróforos de la serie Alexa. En el caso de Alexa-488 se muestran los espectros de la sonda libre o unida a proteína (Alexa-488-Pr)

La figura 43, muestra los espectros de absorción y emisión de las sondas Alexa-350, -488, -546 y -647; ilustrando el diferente grado de solapamiento espectral. Para Alexa-488 se muestra el corrimiento espectral que sufre al unirse covalentemente a la proteína. Ningún corrimiento fue detectado para los otros fluoróforos.

Los valores del coeficiente de extinción molar del aceptor en el máximo de absorción (ϵ_{Amax}), rendimiento cuántico (Q_D), solapamiento espectral ($J(\lambda)$) y la distancia de Förster (R_0) para diferentes pares donor/aceptor de la serie Alexa son mostrados en la tabla III-2. Considerando el corrimiento espectral de Alexa-488 cuando se une a la proteína, el R_0 estimado para homo-FRET se incrementa en menos del 10% (de 4,7 a 5,1 nm), pero no hay un cambio significativo en el R_0 para hétero-FRET desde Alexa-350 a esta sonda, o si Alexa-488 se usa como donor hacia Alexa-546 o -647 como aceptores (no mostrados).

Donor	Aceptor	ϵ_{Amax} ($M^{-1}cm^{-1}$)	Q_D	$J(\lambda)$	R_0 (nm)	Rango sensible (nm)
Homo-FRET						
Alexa-350		$1,9 \cdot 10^4$	0,55	$6,6 \cdot 10^{11}$	1,3	0,6 - 2,2
Alexa-488		$7,2 \cdot 10^4$	0,92	$7,3 \cdot 10^{14}$	4,7	2,3 - 8,0
Alexa-488-Pr		$7,2 \cdot 10^4$	0,92	$1,2 \cdot 10^{15}$	5,1	2,5 - 8,7
Alexa-546		$9,3 \cdot 10^4$	0,79	$3,6 \cdot 10^{15}$	5,9	2,9 - 10
Alexa-647		$2,6 \cdot 10^5$	0,33	$1,4 \cdot 10^{16}$	6,4	3,2 - 11
Hetero-FRET						
A-350	A-488	$7,2 \cdot 10^4$	0,55	$1,0 \cdot 10^{15}$	4,5	2,2 - 7,6
A-350	A-488-Pr	$7,2 \cdot 10^4$	0,55	$9,3 \cdot 10^{14}$	4,5	2,2 - 7,6
A-350	A-546	$9,3 \cdot 10^4$	0,55	$3,5 \cdot 10^{14}$	3,8	1,9 - 6,5
A-350	A-647	$2,6 \cdot 10^5$	0,55	$7,6 \cdot 10^{13}$	2,9	1,4 - 4,9

A-488	A-546	9,3 10 ⁴	0,92	2,8 10 ¹⁵	5,8	2,9 - 9,9
A-488	A-647	2,6 10 ⁵	0,92	1,6 10 ¹⁵	5,3	2,6 - 9,0
A-546	A-647	2,6 10 ⁵	0,79	7,9 10 ¹⁵	6,8	3,4 - 12

Tabla III-2. Valores de ϵ_{Amax} , Q_D , $J_{(\lambda)}$, R_0 , y rango de distancia en el que son sensibles, los diferentes pares donor/aceptor de la serie Alexa en homo- y hétero-FRET.

La figura 44 muestra cómo depende la eficiencia de FRET de la distancia relativa a R_0 según [e7]. Puede verse que la eficiencia es muy sensible a pequeños cambios de R en las cercanías de R_0 (esto es variaciones de R/R_0 en torno al valor de 1), pero totalmente insensible fuera del rango entre $0,5 R_0$ y $1,7 R_0$. El rango de sensibilidad dado por estos límites es indicado en la tabla III-2 para los diferentes pares donor/aceptor. Para las determinaciones de distancias intermoleculares en las dHDL, hemos seleccionado distintos pares donor/aceptor con diferentes valores de R_0 y por tanto con sensibilidad en diferentes rangos de distancias, los que se indican resaltados en negrita en la tabla III-2. Para las determinaciones por homo-FRET, se seleccionaron las sondas Alexa-350 y Alexa-488; mientras que para hétero-FRET se usó Alexa-350 como donor en combinación con Alexa-488 o Alexa-647 como aceptores. Las distancias que podrían estimarse con aceptable precisión con los pares seleccionados abarcan desde 0,6 a casi 9 nm, lo que es totalmente adecuado para el sistema de interés ya que las dHDL a usar tienen un diámetro del orden de los 10 nm.

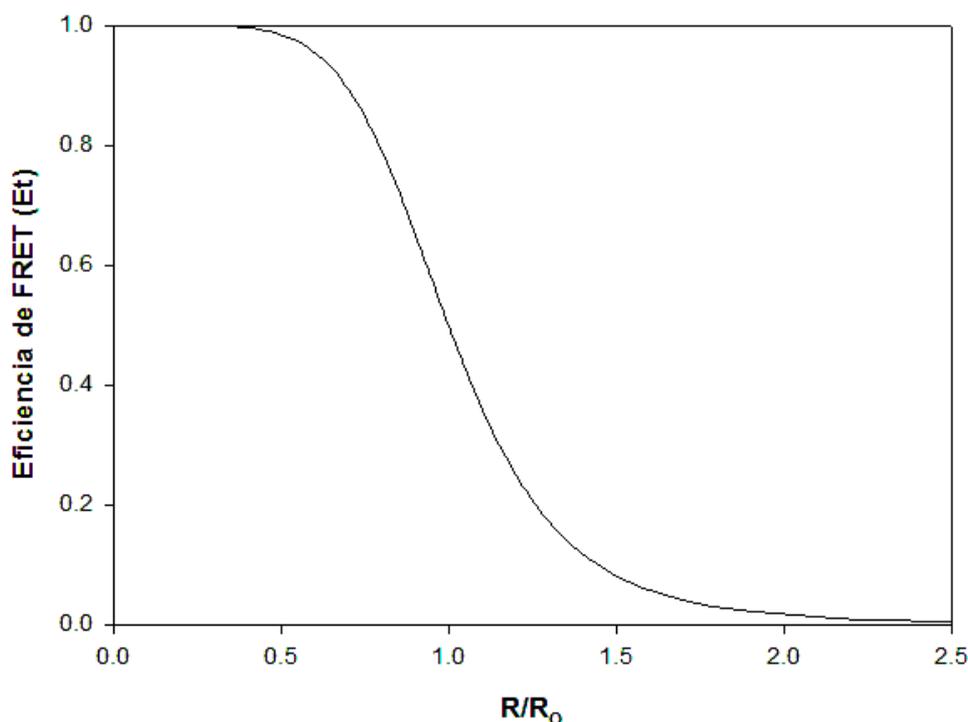


Figura 44. Variación de la eficiencia de FRET (Et) en función de la distancia donador-aceptor (R) relativa a R_0 .

4.5.7 Homotransferencia de energía en dHDL preparadas con mutantes marcadas con Alexa-488.

Las primeras mediciones fueron realizadas en dHDL preparadas por la reacción directa con vesículas de DMPC usando las mutantes de apoA1 marcadas con Alexa-488 solas, o en mezclas con diferentes proporciones de la proteína salvaje. En la figura 45 se muestra la variación de la anisotropía medida en función de la fracción molar de la proteína marcada. Mediciones de intensidad de fluorescencia indicaron solo un pequeño grado de autoextinción (<10%) en el caso de la mutante marcada en la posición 107, que no fue detectado en las otras mutantes. Así, la autoextinción fue ignorada, y se usó directamente la ecuación [e19] para estimar los valores de r_{MN} y r_{MM} , que se indican en la tabla III-3. Estos corresponden respectivamente a las anisotropías en presencia y ausencia de homo-FRET, y fueron usados en las ecuaciones [e10] y [e11] para estimar la distancia intermolecular entre los residuos marcados de la proteína (R) que se indican en la misma tabla. Tanto las proteínas marcadas en la posición 107 como

la marcada en 226 presentan una alta eficiencia de homo-FRET (cercana a 1). Debido a la imprecisión del método para distancias menores de 2,5 nm, sólo podemos decir en estos casos que las distancias intermoleculares 107-107 y 226-226 son iguales o inferiores a este valor límite. Para la distancia intermolecular entre la posición 133, en cambio, se estima un valor de 4,2 nm usando [e10] y de 4,8 nm usando [e11].

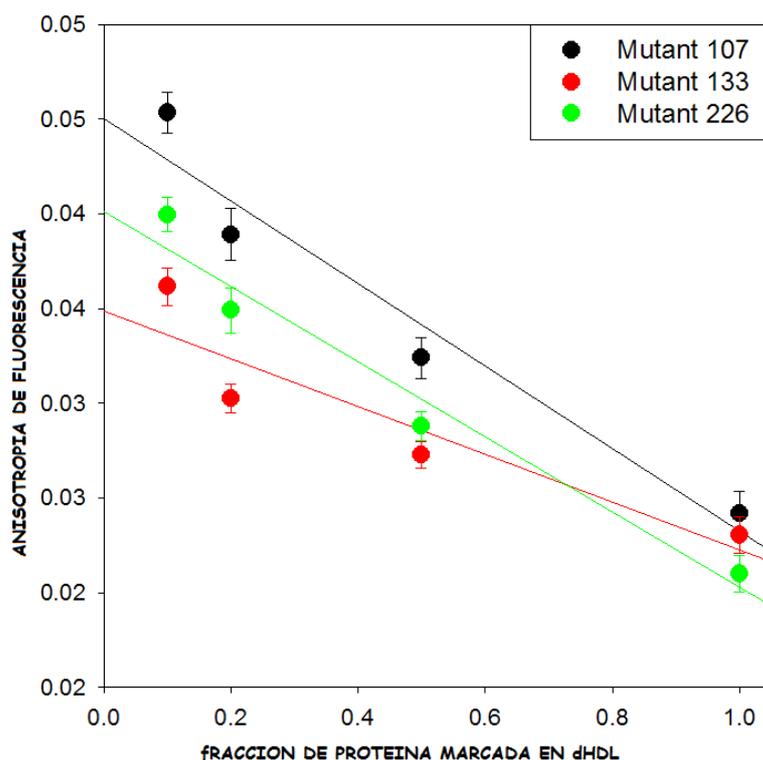


Figura 45. Variación de la anisotropía en función de la fracción molar de proteína marcada con Alexa-488 en dHDL preparadas por la reacción directa con vesículas de DMPC.

Posición marcada	r1 (o r_{MN})	r2 (o r_{MM})	R (nm)
107	0,045	0,023	$\leq 2,5$
133	0,035	0,022	4,2 - 4,8
226	0,040	0,020	$\leq 2,5$

Tabla III-3. Valores de anisotropía en presencia y ausencia de homo-FRET, y estimación de distancias intermoleculares entre los residuos marcados 107-107, 133-133 y 226-226

usando las ecuaciones [e10] y [e11] con $R_0 = 5,1$ nm.

Es de notar que en todos los casos los valores de anisotropía fueron relativamente bajos, lo que indica una alta movilidad de la sonda en su sitio de unión a la proteína (sobre un residuo en la cara hidrofílica de las hélices anfipáticas expuesta al medio acuoso). Esta alta movilidad permite asumir una orientación al azar de los grupos donores y aceptores en el proceso de transferencia de energía, y justifica el uso del valor de $2/3$ para el factor orientacional κ en el cálculo de R_0 (ver arriba).

Las distancias determinadas son compatibles con la configuración LL5/2, y así con la hipótesis planteada de que esta configuración sería mayoritaria en las dHDL preparadas por la reacción directa con vesículas de DMPC. En la configuración LL5/2, se espera una distancia intermolecular muy corta entre los residuos 107, y más larga (del orden de la estimada) entre los residuos 133. En esta configuración, también es esperable que la distancia intermolecular entre los residuos 226 sea intermedia entre la correspondiente a 107-107 y 133-133. Si bien estos datos indican que la distancia 226-226 es menor que la 133-133, no pudieron determinarse con precisión las distancias 107-107 y 226-226, por ser muy cortas en relación al R_0 .

4.5.8 Estimación de distancias intermoleculares en dHDL reconstituídas con proteínas marcadas con Alexa-350 mediante determinaciones de autoextinción y homo-FRET.

Como Alexa-350 presenta un valor de R_0 para homo-FRET considerablemente menor que Alexa-488 (ver tabla III-2), se intentó con esta sonda determinar con mayor precisión las distancias intermoleculares que no pudieron determinarse con Alexa-488. En este caso, se reconstituyeron dHDL por los dos métodos: a) la reacción directa con vesículas de DMPC a 24°C (dHDL que denominamos SC, por sin colato), y b) por el método de diálisis con colato (discos denominados CC, por reconstituidos con colato). En los dos casos, las dHDL se prepararon individualmente con las 3 proteínas mutantes (K107C, K133C y K226C) marcadas con el derivado maleimilado de Alexa-350, ya sea sin diluir ($f_M=1$) o diluidas con

proporciones crecientes ($f_M=0.5$ y $f_M=0.25$) de apoA1 tipo salvaje. También se realizaron otras dos preparaciones (una por cada método: SC o CC) de dHDL con la proteína salvaje, que se utilizaron como control para descontar la señal inespecífica. En las 20 preparaciones, se generaron dHDL de tamaño homogéneo (≈ 140 kD) como se detectó por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente en condiciones no denaturalizantes.

En estas preparaciones de dHDL se midieron: a) Los espectros de emisión de triptofano (entre 300 y 500 nm) por excitación a 290 nm, y de emisión del Alexa-350 (entre 360 y 600 nm) por excitación a 355 nm (en ambos casos se usó un ancho de banda de 4 nm); y b) la anisotropía de la fluorescencia de Alexa-350 (excitación a 350 nm y emisión a 440 nm, con 32nm de ancho de banda). Luego de estas mediciones, las muestras fueron mezcladas (en proporción 1/1 v/v) con una solución de Guanidina-HCl 6,0 M; y se volvieron a medir los espectros de emisión del Alexa-350.

La forma y posición de los máximos de los espectros de emisión del triptófano de las dHDL preparadas con las mutantes marcadas fueron muy similares al de las dHDL preparadas con la apoA1 salvaje (no mostrado), indicando que la marcación con Alexa-350 no afecta el plegado ni la conformación general de la proteína en los discos.

Para cuantificar la intensidad de emisión de Alexa-350 y la eficiencia de autoextinción, los espectros de excitación a 350 nm fueron integrados entre 390 y 560 nm. Los valores de la integral para las dHDL intactas (antes del agregado de Guanidina-HCl) fueron divididos por los correspondientes valores de las integrales de los espectros en presencia de Guanidina-HCl. Esto permite al mismo tiempo normalizar los valores de intensidad de Alexa-350 por la concentración de proteína marcada y corregir por eventuales cambios en la concentración original durante la diálisis en las dHDL CC. Los valores así obtenidos fueron a su vez divididos por el valor de las muestras de dHDL conteniendo sólo la proteína marcada (o $f_M=1$) y se muestran en la figura 46 en función de la fracción molar de proteína marcada (f_M).

Estas curvas siguen la función descrita por la ecuación [e16], por lo que la ordenada de origen corresponde a la relación de los rendimientos cuánticos en

ausencia y presencia de autoextinción (Q_{MN}/Q_{MM}), y de la misma puede calcularse la eficiencia de autoextinción (E_a) por la ecuación [e17]. Los valores de Q_{MN}/Q_{MM} y E_a obtenidos son indicados en la tabla III-4. En el caso de la mutante marcada en la posición 107, el fenómeno de autoextinción ocurre con una eficiencia cercana al 50% en las dHDL preparadas sin colato por la reacción espontánea a la T_m de la DMPC, pero dicho fenómeno está ausente en las dHDL preparadas por diálisis con colato. El comportamiento inverso se observó con la proteína marcada en la posición 133, que presenta ausencia de autoextinción en las dHDL preparadas sin colato, y una alta eficiencia de autoextinción (65%) en las dHDL preparadas por diálisis con colato. En el caso de la proteína marcada en la posición 226 se observó una tendencia similar a la marcada en 107, pero el grado de eficiencia de autoextinción es mucho menor (15%). Así, estos datos indican que los residuos en posición 107 de las dos moléculas de apoAI quedan en estrecho contacto entre sí en las dHDL SC, pero alejados entre sí en las dHDL CC, mientras que lo contrario ocurre para los residuos 133.

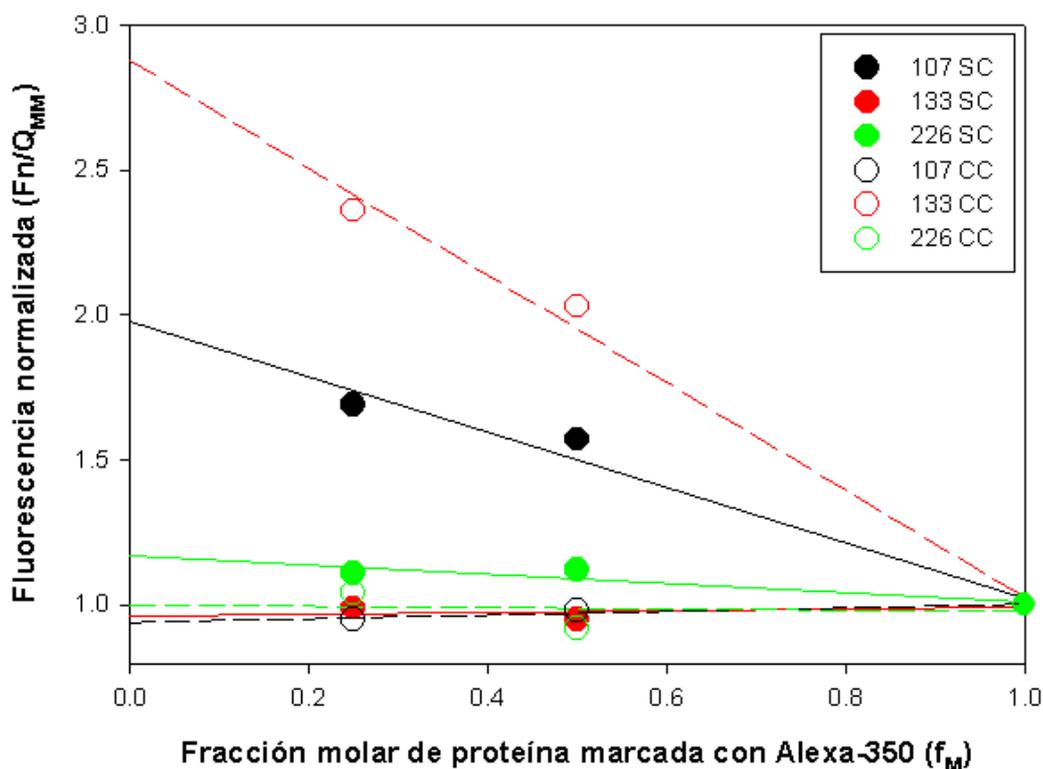


Figura 46. Autoextinción de la emisión de fluorescencia en dHDL reconstituídas con las mutantes de apoAI marcadas con Alexa-350. Los valores de intensidad de fluorescencia normalizados por la concentración de proteína marcada y el valor correspondiente a $f_M=1$ (F_n/Q_{MM}) se grafican en función de f_M .

Posición marcada	Método de reconstitución	Q_{MN}/Q_{MM}	Eficiencia de autoextinción (Ea)
107	SC	1.988	0,497
107	CC	~1	~0
133	SC	~1	~0
133	CC	2,890	0,654
226	SC	1,176	0,150
226	CC	~1	~0

Tabla III-4. Eficiencia de autoextinción de la fluorescencia de Alexa-350 en dHDL de las mutantes marcadas en las diferentes posiciones y reconstituídas por la reacción directa con vesículas de DMPC (SC) o por diálisis con colato (CC).

Los datos de anisotropía, modificados como $r_t(1 - f_M E_a)$, se muestran en función de la fracción molar de proteína marcada (f_M) en la figura 46. Mediante el ajuste de la ecuación [e21] a estos datos, se calcularon las anisotropías en ausencia ($r_{t_{MN}}$ o r_1) y presencia ($r_{t_{MM}}$ o r_2) de homo-FRET, respectivamente. Estas son indicadas en la tabla III-5 junto a las distancias estimadas por las ecuaciones [e10] y [e11]. Estos datos indican que la distancia intermolecular 107-107 es de 0,8-0,9 nm en las dHDL preparadas por la reacción directa con DMPC; pero es mayor de 2,2 nm en las dHDL preparadas por diálisis con colato. Los residuos 133, en cambio, se encuentran entre sí a una distancia de 0,7-0,8 nm en las dHDL preparadas por diálisis con colato, pero más alejados entre sí (1,6-1,8 nm) en las dHDL preparadas por la reacción directa. La distancia estimada entre los residuos 226, en cambio, es de 1,5-1,7 nm en ambos tipos de dHDL.

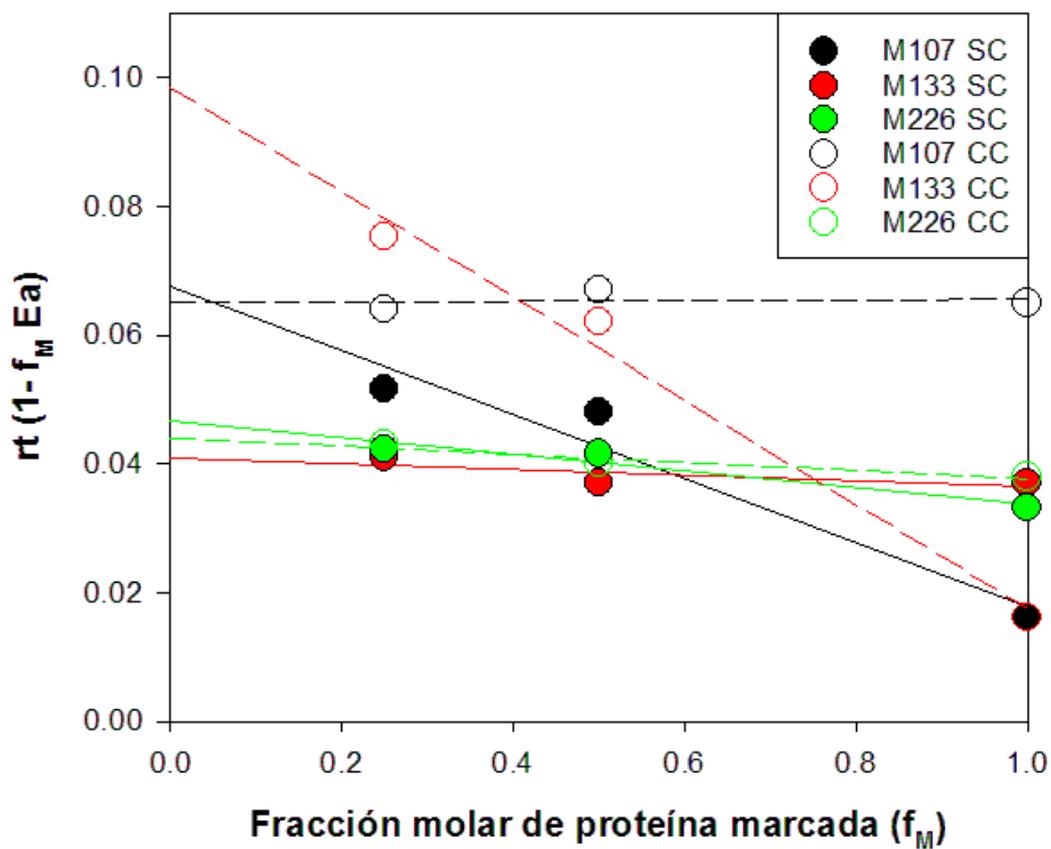


Figura 47. Detección de homo-FRET de Alexa-350 en dHDL preparadas por la reacción directa con vesículas de DMPC (SC) o por diálisis con colato (CC).

Muestra	rt_{MN} o $r1$	rt_{MM} o $r2$	R1 (nm)	R2 (nm)
M107 SC	0.0677	0.0355	0,8	0,9
M133 SC	0.0410	0.0364	1,6	1,8
M226 SC	0.0466	0.0396	1,5	1,7
M107 CC	0.0650	0.0656	> 2,2	> 2,2
M133 CC	0.0984	0.0505	0,7	0,8
M226 CC	0.0440	0.0377	1,5	1,7

Tabla III-5. Distancias intermoleculares entre las posiciones homólogas 107-107, 133-133 y 226-226 en dHDL preparadas por la reacción directa con vesículas de DMPC o por diálisis con colato; determinadas por homo-FRET con Alexa-350. R1 y R2 son las distancias estimadas por [e10] y [e11], respectivamente.

Salvo la distancia algo más corta entre los residuos 133 en las dHDL preparadas por la reacción directa indicada por el homo-FRET de Alexa-350 (1,6-1,8 nm) en comparación con el homo-FRET de Alexa-488 (4,2-4,8 nm), los datos son cualitativamente concordantes y sostienen la hipótesis de que la configuración mayoritaria en estas dHDL sería la LL5/2. Junto a los datos de autoextinción, el homo-FRET de Alexa-350 indica que en las dHDL preparadas por diálisis con colato, la configuración mayoritaria de la apoA1 sería la LL5/5.

4. 5.9 Hetero-FRET con Alexa-350 como donador y Alexa-488 o Alexa-647 como aceptor.

Para las medidas de hetero-FRET se reconstituyeron dHDL por ambos métodos (SC o CC) partiendo de mezclas (1/1 en relación molar) de cada una de las mutantes marcadas con Alexa-350 (donor D) con las correspondientes mutantes marcadas con Alexa-488 o Alexa-647 (aceptores A) o con apoA1 tipo salvaje (no marcada N). Los espectros de emisión (con excitación a 350 nm) fueron registrados antes y después de mezclar las muestras con un volumen igual de guanidina-HCl 6,0 M (concentración final = 3,0 M).

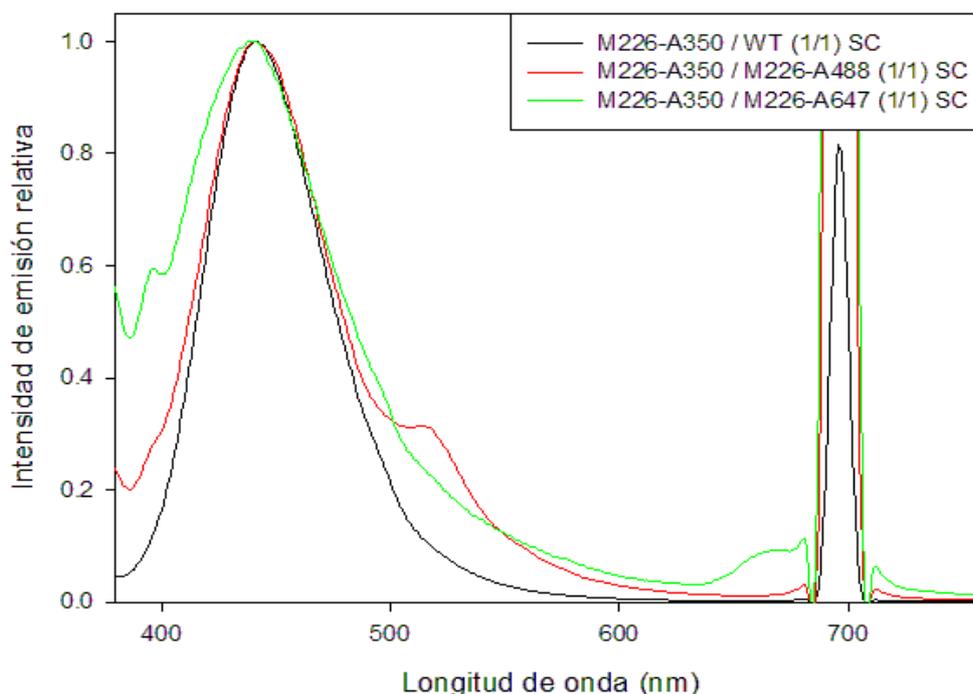


Figura 48. Espectros de emisión de dHDL SC preparadas con la mutante marcada en posición 226 con Alexa-350 mezclada en proporción equimolar con: a) la proteína salvaje no marcada (curva negra), b) la mutante 226 marcada con Alexa-488 (curva roja), o c) la mutante 226 marcada con Alexa-647 (curva verde).

Espectros típicos obtenidos antes del agregado de guanidina se muestran en la figura 48. La existencia de hetero-FRET resulta en un aumento en la emisión del aceptor como puede verse en la región de 520 nm cuando el aceptor es Alexa-488 o en la región de 680 nm cuando el aceptor es Alexa-647 (esto último es observable a pesar de la interferencia del pico de 2do orden de scattering a 700 nm). En guanidina-HCl 3,0 M; la emisión del aceptor y por tanto el FRET desaparecen (no mostrado) debido a que la apoAI se encuentra en forma monomérica y desplegada.

Muestra / Par D-A	F_{tDA}/F_{tDN}	$E_{t_{ap}}$	E_t	R_{ap} (nm)	R (nm)
M107 A-350/A-488 SC	0.241	0.759	> 1.0	3,7	< 2,2
M107 A-350/A-647 SC	0.299	0.701	> 1.0	2,5	< 1,4
M107 A-350/A-488 CC	0.650	0.350	0.700	5,0	3,9
M107 A-350/A-647 CC	0.830	0.167	0.340	3,8	3,2
M133 A-350/A-488 SC	0.840	0.160	0.320	5,9	5,1
M133 A-350/A-647 SC	0.945	0.055	0.110	4,7	4,1
M133 A-350/A-488 CC	0.250	0.750	> 1.0	3,7	< 2,2
M133 A-350/A-647 CC	0.273	0.727	0.978	2,5	1,5
M226 A-350/A-488 SC	0.645	0.354	0.656	5,0	4,0
M226 A-350/A-647 SC	0.715	0.285	0.527	3,4	2,8
M226 A-350/A-488 CC	0.726	0.274	0.548	5,3	4,4
M226 A-350/A-647 CC	0.855	0.145	0.290	3,9	3,4

Tabla III-6. Estimación de distancias intermoleculares por hetero-FRET. La relación de intensidades F_{tDA}/F_{tDN} obtenida como se explicó en el texto, se usó para calcular las eficiencias aparente ($E_{t_{ap}}$) y real (E_t) usando las ecuaciones [e24] y [e25] junto a las

eficiencias de autoextinción de la tabla III-4. Las distancias aparente (R_{ap}) y real (R) se calcularon de las correspondientes eficiencias usando valores de R_0 de 4,5 y 2,9 nm para los pares Alexa-350/Alexa-488 y Alexa-350/Alexa-647, respectivamente.

El hetero-FRET también resulta en la disminución de la emisión del donador Alexa-350 (no notada en la figura por la normalización de los espectros), lo que se usó aquí para la cuantificación de la eficiencia. La integral (entre 390 y 480 nm) del espectro en ausencia de guanidina-HCl fue dividida por la del correspondiente espectro en presencia de guanidina-HCl para obtener los valores de intensidad total FtDA (en las muestras conteniendo donador y aceptor) o FtDN (en las muestras conteniendo donador y proteína salvaje no marcada) correspondientes a las ecuaciones [e22] y [e23]. La relación entre estos valores se muestra en la tabla III-6, junto con las eficiencias de hetero-FRET aparente (E_{tap}) y real (E_t), así como las distancias aparente (R_{ap}) y real (R) derivadas de las mismas.

Las distancias obtenidas indican claramente que la distancia intermolecular 107-107 es mucho más corta en las dHDL preparadas por la reacción espontánea con vesículas de DMPC que en las obtenidas por diálisis con colato. La distancia intermolecular 133-133, en cambio, es mayor en las dHDL preparadas por la reacción directa que en las preparadas por diálisis con colato. Para la proteína marcada en 226, por otro lado, la distancia intermolecular estimada entre los grupos fluorescentes no cambia demasiado con el método de reconstitución. Nuevamente, esto es consistente con la hipótesis de que las dHDL preparadas por la reacción directa presentarían mayoritariamente la configuración LL5/2, mientras que las dHDL preparadas por diálisis con colato adoptan preferencialmente la configuración LL5/5.

4.5.10. Determinaciones de tiempo de vida media de fluorescencia

El decaimiento de la emisión del Alexa-350 fue medido en las dHDL conteniendo las mutantes marcadas con esta sonda en mezcla equimolar con la mutante correspondiente marcada con Alexa-488 o Alexa-647, estos espectros se obtuvieron mediante un equipo JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11 con LIFETIME TCSPC con 2 nm de ancho de rejilla de entrada y de salida. Se utilizó un paso de longitud de onda de barrido 1 nm.

La figura 49 muestra una curva de decaimiento típica luego de un pulso de excitación.

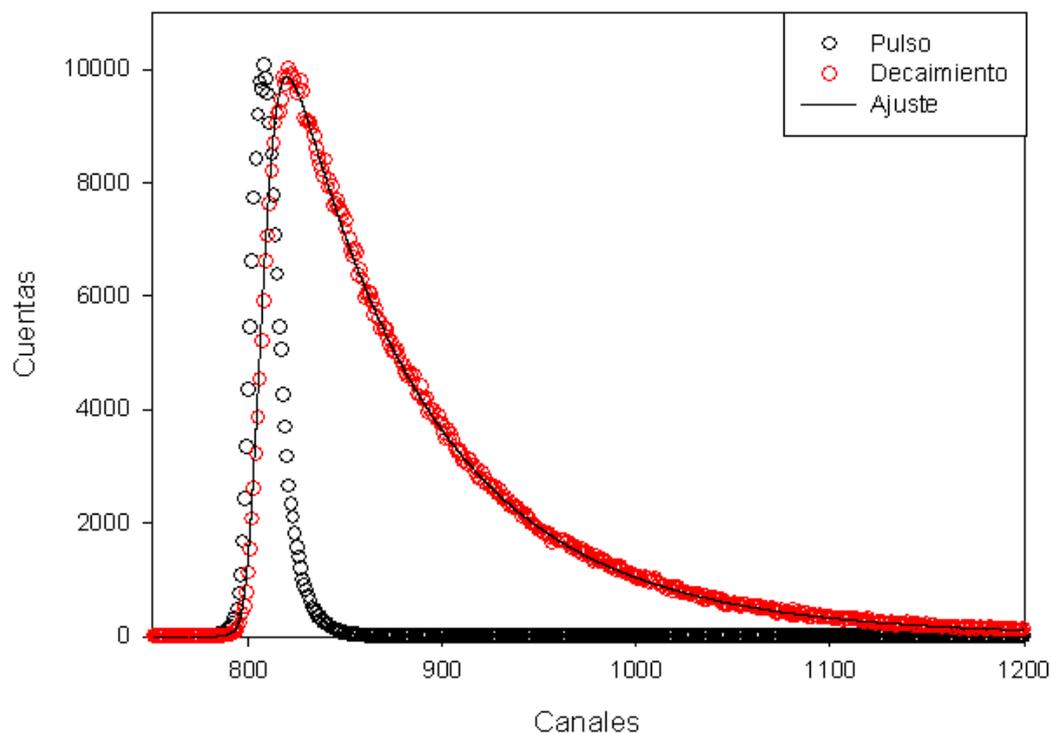


Figura 49. Curva de decaimiento de la emisión de Alexa-350

El decaimiento es complejo y requiere del uso de la suma de dos a tres exponenciales para un buen ajuste. El lifetime medio ($\langle \tau \rangle = \sum a_i \tau_i$, donde a_i son las amplitudes relativas de cada componente de lifetime τ_i) es informado en la tabla III-7.

Mutante	Donor / Aceptor	Tipo de dHDL	vida media $\langle \tau \rangle$ (ns)
K107C	A-350 / A-488	SC	2,4
K107C	A-350 / A-647	SC	2,1
K107C	A-350 / A-488	CC	3,3
K107C	A-350 / A-647	CC	3,0
K133C	A-350 / A-488	SC	1,9

K133C	A-350 / A-647	SC	2,1
K133C	A-350 / A-488	CC	0,9
K133C	A-350 / A-647	CC	0,6
K226C	A-350 / A-488	SC	3,7
K226C	A-350 / A-647	SC	3,7
K226C	A-350 / A-488	CC	3,4
K226C	A-350 / A-647	CC	3,5

Tabla III-7. Tiempos de vida medio ($\langle\tau\rangle$) de la emisión de Alexa-350 en dHDL SC y CC de las mutantes marcadas con esta sonda en combinación 1/1 en mol con las correspondientes mutantes marcadas con Alexa-488 o Alexa-647.

Cuando el par donador/aceptor se localiza en la posición 107, $\langle\tau\rangle$ es más corto en las dHDL reconstituídas por la reacción directa con las vesículas de DMPC (SC) que en aquellas reconstituídas por la diálisis de micelas mixtas de la proteína, DMPC y colato (CC). Lo contrario ocurre cuando el par donador/aceptor está localizado en la posición 133, siendo $\langle\tau\rangle$ en este caso menor en las dHDL CC que en las dHDL SC. Para las dHDL de la mutante marcada en 226, $\langle\tau\rangle$ no se modifica demasiado con el método de reconstitución. Así, según este análisis, el homo-FRET desde Alexa-350 a los aceptores Alexa-488 o Alexa-647 parece ser más eficiente en las dHDL SC que en las CC cuando la posición marcada es 107, y viceversa cuando la marcación es en la posición 133. Sin embargo, hay algunas cuestiones que aún no están totalmente claras, como la causa de los relativamente bajos valores de $\langle\tau\rangle$ encontrados en los dos tipos de dHDL de la proteína marcada en 133 que no tienen total correlación con los cambios observados en la intensidad de fluorescencia.

4.6. Determinaciones de Resonancia Electrónica Paramagnética (EPR)

Otro de los objetivos propuestos fue marcar a las mutantes de cisteína con una sonda de spin (TEMPO-maleimida) para disponer de una estrategia alternativa para estimar las distancias intermoleculares en las dHDL, a través de determinaciones de acoplamiento spin-spin. El fenómeno de acoplamiento spin-spin resulta en un apagamiento y ensanchamiento de la señal de EPR y ocurre por la colisión (o acercamiento a una distancia mínima) de los grupos portadores de los radicales libres que generan la señal.

Las determinaciones de EPR fueron realizadas en parte en el Laboratorio de Resonancia Paramagnética Electrónica de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá; y en el laboratorio EPR de la Universidad Nacional del Litoral en Santa Fe. Primeramente, para conocer cómo el espectro de EPR del TEMPO es afectado por el acoplamiento spin-spin, se realizaron mediciones con una concentración fija de TEMPO-maleimida y concentraciones crecientes de ditionitrito (DTT). El DTT contiene dos grupos -SH y por tanto puede acoplar por unión tioeter a dos moléculas de TEMPO-maleimida. Se detectó una disminución en la intensidad al aumentar la concentración de DTT atribuible a la dimerización y acoplamiento spin-spin (no mostrado), lo que indicó la posibilidad de detectar el fenómeno.

Posteriormente, las tres mutantes de cisteína fueron marcadas con TEMPO-maleimida siguiendo el mismo protocolo usado en la marcación con derivados maleimilados de sondas fluorescentes. Los espectros de las mutantes marcadas fueron registrados en el estado libre de lípidos, así como también en dHDL reconstituídas por la reacción directa con vesículas de DMPC (SC) o por el método de diálisis con colato (CC). Como se observa en la figura III-29, los espectros de las dHDL (tanto SC como CC) presentan una muy baja intensidad en comparación con las proteínas libres de lípidos. En la tabla III-8 se indican los valores de intensidad (obtenidos por doble integración del espectro) absolutos y relativos a la proteína libre de lípidos. En la mutante marcada en 107 se observa prácticamente la misma disminución de intensidad en ambos tipos de dHDL. En el caso de la mutante marcada en 133, se observa una mayor disminución de la señal de EPR en las dHDL con colato que en las sin colato. Esta disminución de

intensidad respecto del estado libre es muy alta y ocurre en todas las muestras, por lo que es difícil atribuirla completamente al fenómeno de spin-spin coupling. La posibilidad de que alguna impureza en los lípidos sea responsable del apagamiento de la señal debe ser explorada en el futuro.

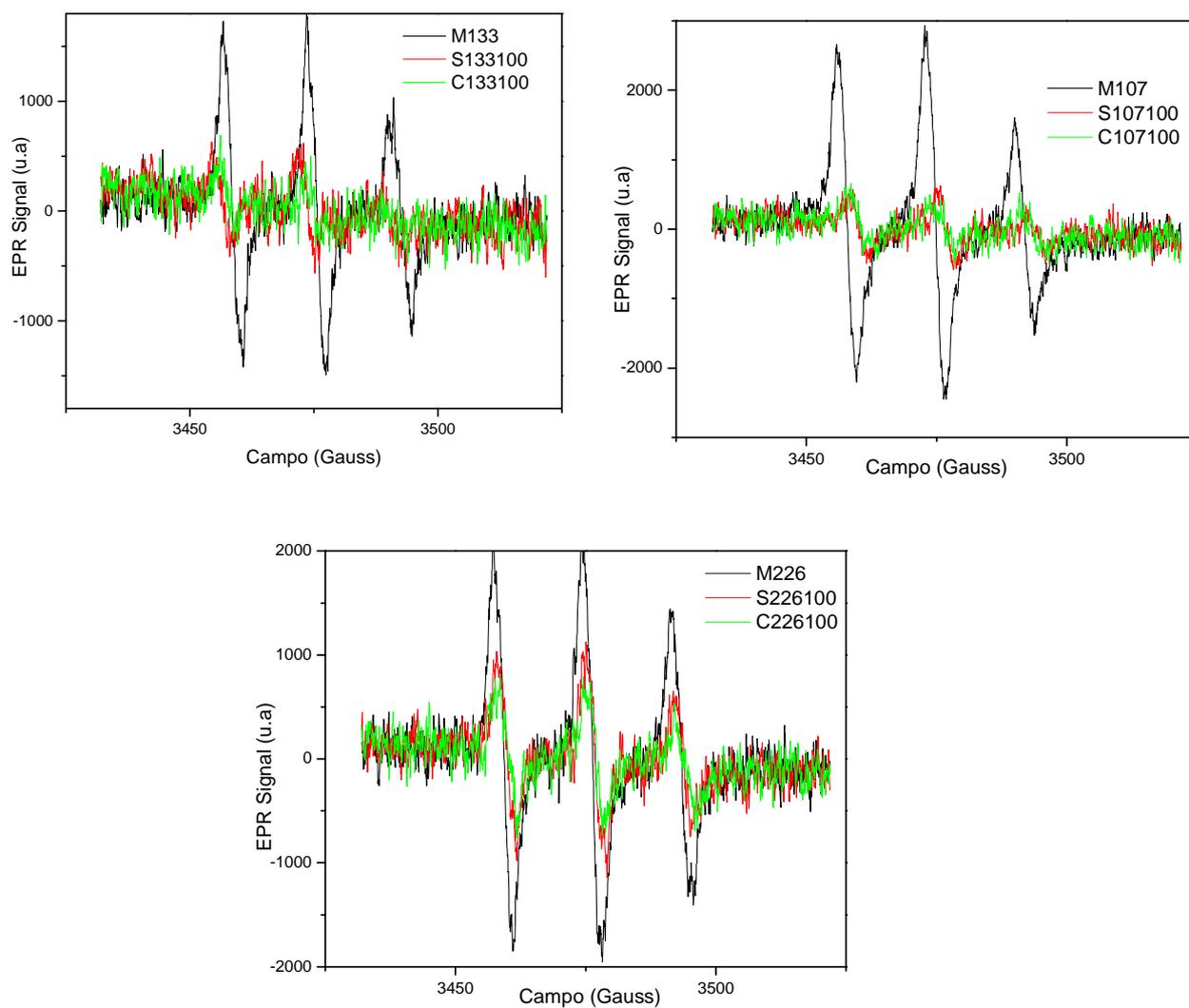


Figura 50. Espectros de EPR de cada una de las mutantes en el estado libre de lípidos o como dHDL reconstituidas sin (S) y con (C) colato.

a)

	K107C	K133C	K226C
Solución	198	89	153
Sin colato	44	49	84
Con colato	41	34	70

b)

	K107C	K133C	K226C
Solución	1.00	1.00	1.00
Sin colato	0.22	0.55	0.55
Con colato	0.21	0.38	0.46

Tabla III-8. a) Doble Integral de señal de EPR, b) Valores de la doble integra relativos a la proteína libre de lípidos.

4.7. Estimación de las distancias intermoleculares 107-107, 133-133 y 226-226 en los cristales de apoA-I Δ 1-43

La estructura cristalina del fragmento de apoA-I que carece de los primeros 43 residuos del extremo N (apoA-I Δ 1-43) consiste de un tetrámero formado por dos dímeros idénticos que se encuentran en la configuración LL5/5. Esta estructura cristalina fue la base para el desarrollo del modelo del doble cinturón para las dHDL. Para comparación con las distancias determinadas por FRET en las dHDL reconstituídas, se determinaron las distancias intermoleculares entre los C α de los residuos 107-107, 133-133 y 226-226 en el cristal de apoA-I Δ 1-43. Se usó el programa Jmol con las coordenadas de dicha estructura cristalina (ver figura III-30) obtenida de la base de datos Protein Databank (PDB) y las distancias obtenidas se muestran en la tabla III-9.

Residuos	Distancias en nm
107-107	6,4
133-133	1,4
226-226	2,9

Tabla III-9. Distancias intermoleculares en la estructura cristalina de apoA-I Δ 1-43 obtenidas mediante programa Jmol.

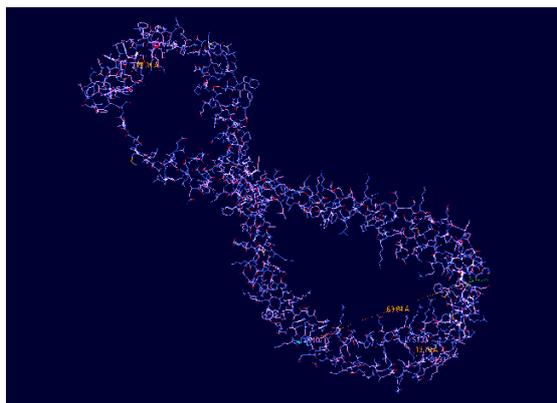


Figura 51. Imagen obtenida programa jmol de la estructura cristalina de apoA-I Δ 1-43

4.8. Propiedades fisiológicas de las dHDL SC y CC. Remoción de colesterol de cultivos celulares

Los experimentos mostrados en las secciones anteriores indicaron que la configuración de apoAI en las dHDL depende del método utilizado en su reconstitución. Para conocer si el arreglo configuracional diferente entre las dHDL SC y CC tiene alguna importancia en cuanto a la función biológica de las dHDL, se estudió la capacidad de estos complejos reconstituídos para promover la remoción de colesterol de células en cultivo. Se reconstituyeron dHDL con apoAI y DMPC mediante el método de 1) dialisis con colato y 2) por micelización espontánea de vesículas en la T_m del fosfolípido. Seguidamente se realizaron ensayos de remoción de colesterol en macrófagos murinos RAW 264,7. Los mismos fueron previamente activados con 8-Br-AMPC para estimular la expresión de los transportadores ABC. El modelo celular se eligió principalmente por su rol protagónico en la formación de placas aterogénicas.

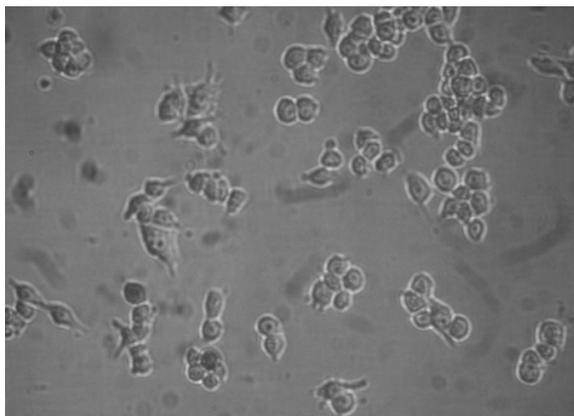


Figura 52. Tipo de Células RAW 264.7, usadas en el experimento

Luego de alcanzar un 100 % de confluencia, las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con una solución de buffer fosfato salino (PBS PH: 7.4), y se agregó el medio de cultivo (MEM sin suero fetal bovino) complementado con albúmina bovina (BSA-2mg/ml) y colesterol (50 μ g/ml), [3H]-colesterol (0.5 μ Ci/ml) durante 41 horas a 37°C. Para equilibrar los *pooles* de colesterol, las células fueron dejadas 8 horas con MEM conteniendo 1 mg/ml de BSA. Luego de dos lavados con PBS se realizó el tratamiento celular con 5 μ M de dHDL reconstituidas (SC y CC) durante 12 horas. Como control se usaron células incubadas con MEM libre de proteínas. Luego de las doce horas el medio es colectado y medida su radioactividad por centelleo líquido. El porcentaje de remoción de colesterol fue estimado en relación a la radioactividad total de [14 C] colesterol incorporada en las células. Para ello se extrajeron los lípidos y la radioactividad se cuantificó mediante centelleo líquido. Todos los experimentos fueron hechos por triplicado y para el análisis estadístico se utilizó el test de Student.

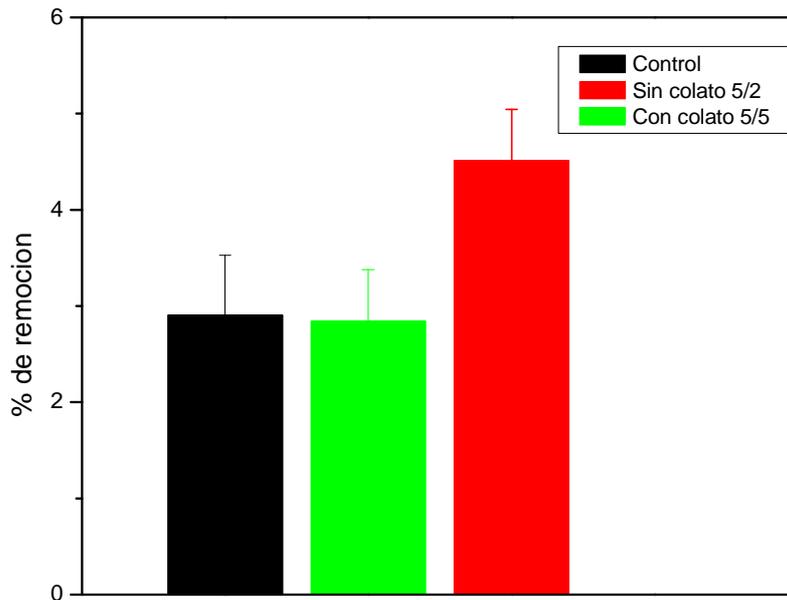


Figura 53. Remoción de colesterol de células RAW mediado por dHDL reconstituidas con colato y sin colato

Los resultados de la figura 53 muestran que cuando las células son incubadas con dHDL formadas por la reacción directa en ausencia de detergentes la remoción es altamente significativa con respecto a las dHDL preparadas por diálisis con colato. Estas últimas fueron inactivas, sin una diferenciarse apreciablemente del control de medio sin proteína.

Como vimos en las secciones anteriores, en las dHDL preparadas por la reacción directa con vesículas de DMPC, la apoA1 tendría la configuración LL5/2, por lo que este experimento sugiere que esta sería la configuración activa, mientras que la configuración LL5/5 (presente mayoritariamente en las dHDL CC) sería inactiva en la remoción de colesterol celular. Sin embargo, es conocido de trabajos previos de éste y otros laboratorios (Toledo JD, et al 2012 (86), Gonzalez MC, et al, 2008 (87), Favari E, et al 2009(88)), que dHDL preparadas por diálisis con colato, pero conteniendo un fosfolípido insaturado como POPC, son activas en remover colesterol celular. Así, la falta de actividad de las dHDL CC usadas aquí podría atribuirse al hecho de que contengan el fosfolípido saturado DMPC. Para investigar un poco más profundamente este aspecto, las dHDL SC y CC preparadas con DMPC se agregaron a las células en concentraciones crecientes

entre 0 y 16 μg de apoA1/ml analizando como antes, la liberación de colesterol radioactivo hacia el medio de cultivo. Los resultados se muestran en la figura 54. Se observa que mientras la actividad de las dHDL SC en función de la concentración tiene una dependencia hiperbólica, las dHDL CC presentan un comportamiento sigmoideo. Mientras que a bajas concentraciones ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$), la actividad de las dHDL SC es mayor que la de dHDL CC, a mayores concentraciones la actividad de dHDL CC iguala e incluso supera algo a la de dHDL SC. Aunque la razón exacta es desconocida, es muy probable que este diferente comportamiento se deba a la diferente configuración de apoA1 en los discos.

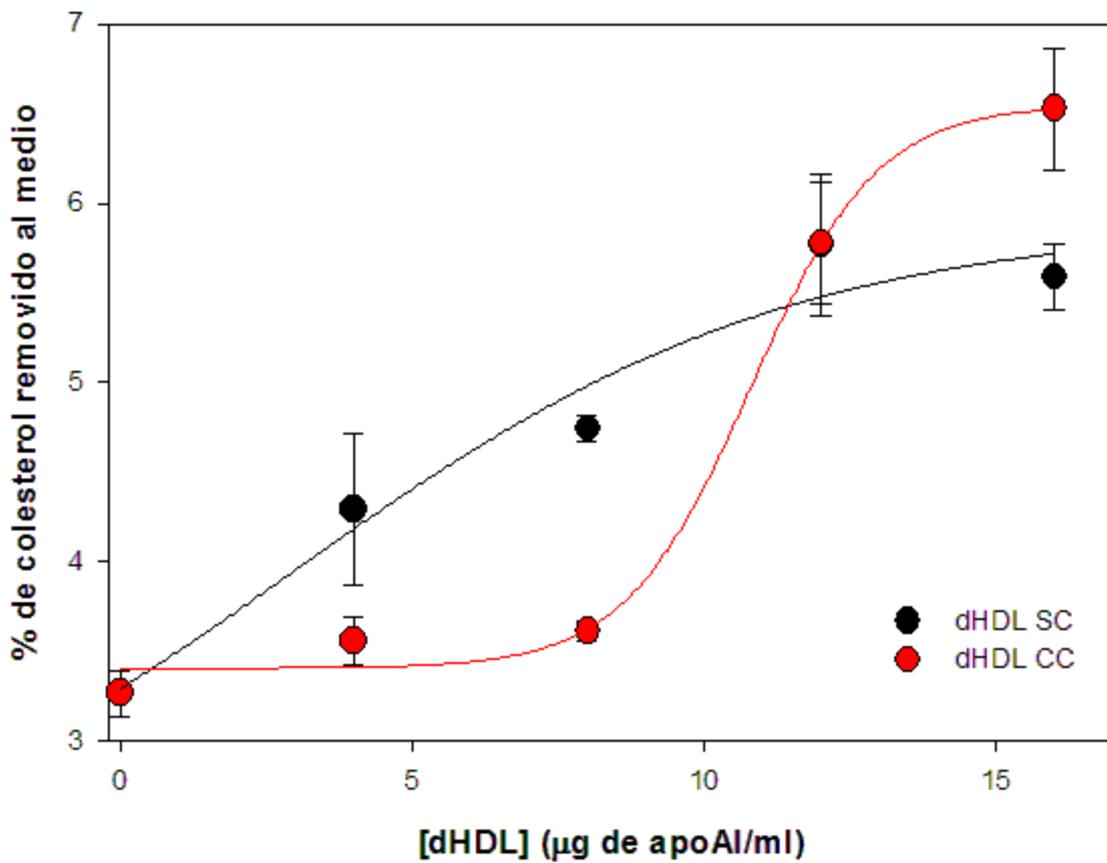


Figura 54. Remoción de colesterol por diferentes concentraciones de dHDL reconstituidas con DMPC por la reacción directa con vesículas a 24°C (SC) o por diálisis con colato (CC).

4.9. Lipidación espontánea de Apolipoproteína A-I: influencia del colesterol y fosfolípidos negativos

Los resultados obtenidos con dHDL reconstituidas con DMPC indicaron que la configuración de apoA-I en las mismas, y algunas propiedades fisiológicas como la remoción de colesterol celular depende del método de reconstitución utilizado. Como se discutirá debajo, la reconstitución por la reacción espontánea en la Tt de DMPC probablemente ocurra por un mecanismo similar a la lipidación "in vivo" de apoA-I mediada por el transportador ABCA1. Por tanto, fue de interés explorar cómo afectan a esta reacción de lipidación espontánea la presencia de otros lípidos que normalmente se encuentran en la membrana celular como el colesterol y fosfolípidos de carga negativa como fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI).

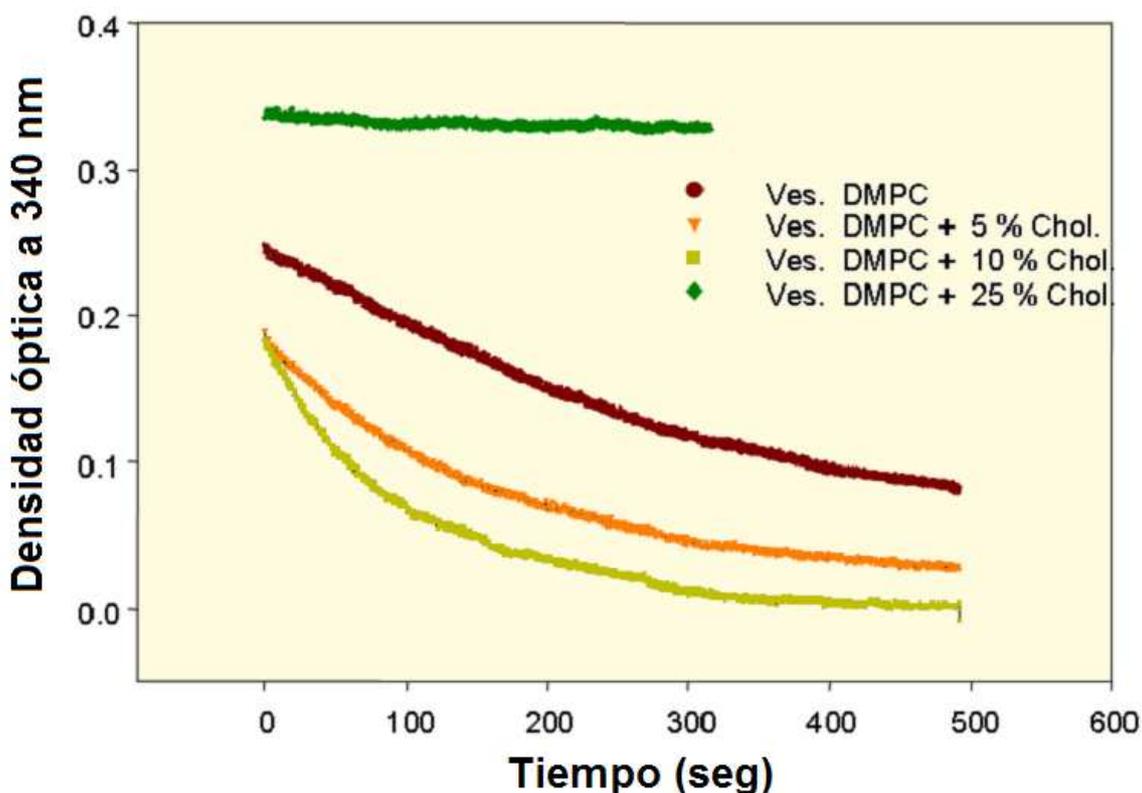


Figura 55. Curvas de micelización espontánea por apoA-I sérica (0,2 mg/ml) a 24°C, de vesículas multilamelares de DMPC (0,2 mg/ml) con diferentes proporciones de colesterol.

La figura 55 muestra las curvas de micelización de liposomas multilamelares de DMPC conteniendo proporciones variables de colesterol. Se observa que la velocidad de la

reacción aumenta al incrementar el contenido de colesterol hasta un 10% (en relación molar), pero disminuye bruscamente al punto de que la reacción es inapreciable para una proporción de colesterol del 25%. Así, pequeñas proporciones de colesterol facilitan la reacción, pero la misma es dificultada a mayores concentraciones, lo que podría atribuirse a la propiedad del colesterol de atenuar la transición de fase.

El gel de la figura 56 muestra los complejos lipoproteicos formados en la reacción (sin ser sometidos a ciclos de temperatura como en la sección 4.2). Se observa que cuando las vesículas contienen 10% de colesterol se genera una población de complejos de mayor tamaño.

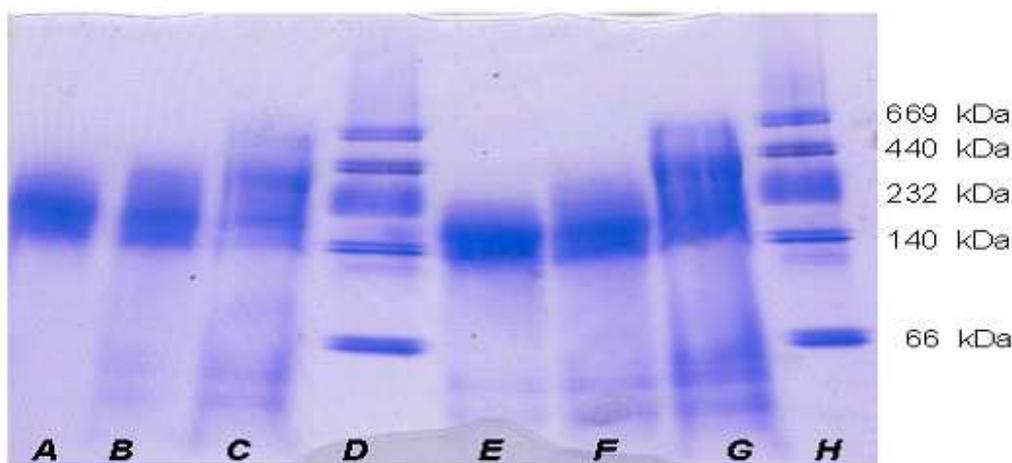


Figura 56. Análisis de los productos de las reacciones de la figura 55 por PAGGE. A y E: vesículas de DMPC sin colesterol; B y F: vesículas de DMPC + 5% de colesterol; C y G: vesículas de DMPC + 10% de colesterol; D y H: estándares de peso molecular.

Como se demostró con DMPG (Surewicz WK, et al 1986 (89)), a diferencia de los fosfolípidos zwitteriónicos (como DMPC o DPPC) que reaccionan sólo en un rango estrecho de temperatura cercano a T_t , los fosfolípidos de carga negativa reaccionan también en el estado líquido-cristalino (encima de T_t) aunque con menor eficiencia que a la T_t . Así, otros lípidos presentes en las membranas celulares que podrían influenciar el proceso de lipidación espontánea de apoA-I son aquellos cargados negativamente como PI y PS. La figura 57 muestra las curvas de micelización de mezclas de DMPC con PI de hígado bovino en diferentes proporciones. Las mediciones se realizaron en la T_t de DMPC (24°C) y por encima de la misma (37°C). A 24°C, la inclusión de un 10% de PI incrementa la velocidad de micelización, pero la misma disminuye con mayores proporciones de PI. A

37°C, la reacción sólo ocurre con una velocidad apreciable con 100% de PI. A diferencia de lo que ocurre con 100% DMPC, la reacción con 100% PI es más rápida a 37 que a 24°C

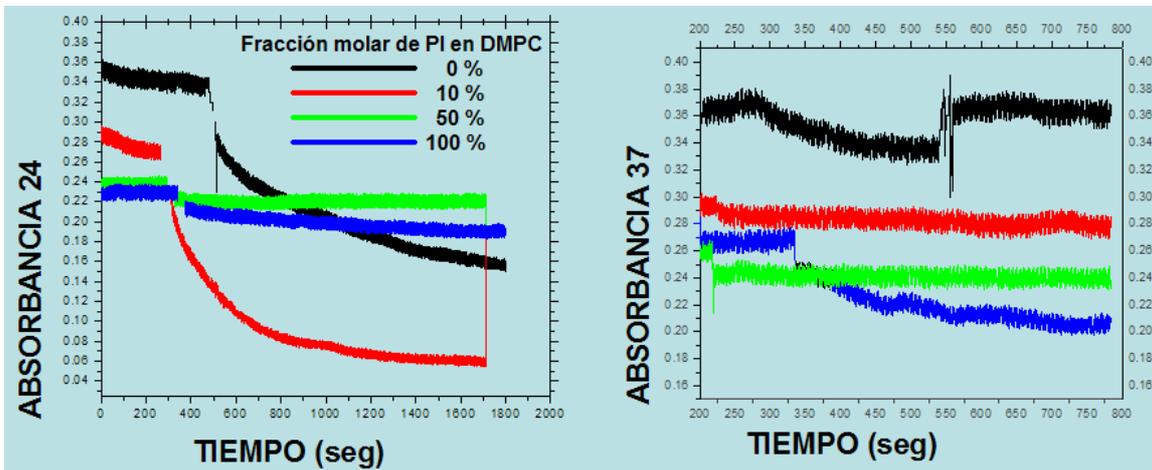


Figura 57. Micelización de liposomas multilamelares de mezclas de DMPC con PI de hígado bovino en diferentes proporciones a 24 °C (izquierda) y 37 °C (derecha).

En el gel de la figura 58 se muestra el análisis por PAGGE de los productos de estas reacciones. Si bien hubo marcadas diferencias en los productos formados dependiendo de la composición de las vesículas, no hay diferencias apreciables entre las reacciones que se llevaron a cabo a 24 y a 37°C. Es de notar que tanto la corrida electroforética como el guardado de las muestras hasta el momento de la corrida fueron hechos a temperatura ambiente (cerca de 24°C). Por esta razón, no podemos concluir que no existan diferencias entre los productos de las reacciones llevadas a cabo a 24 y 37°C. En cuanto a la influencia de la composición de las vesículas, puede observarse en el gel que la inclusión de 10% de PI en las vesículas de DMPC no modifica apreciablemente el tamaño de los complejos lipoproteicos formados (en comparación a DMPC sola), aunque aumenta notablemente la velocidad del proceso de micelización a 24°C (figura III-36).

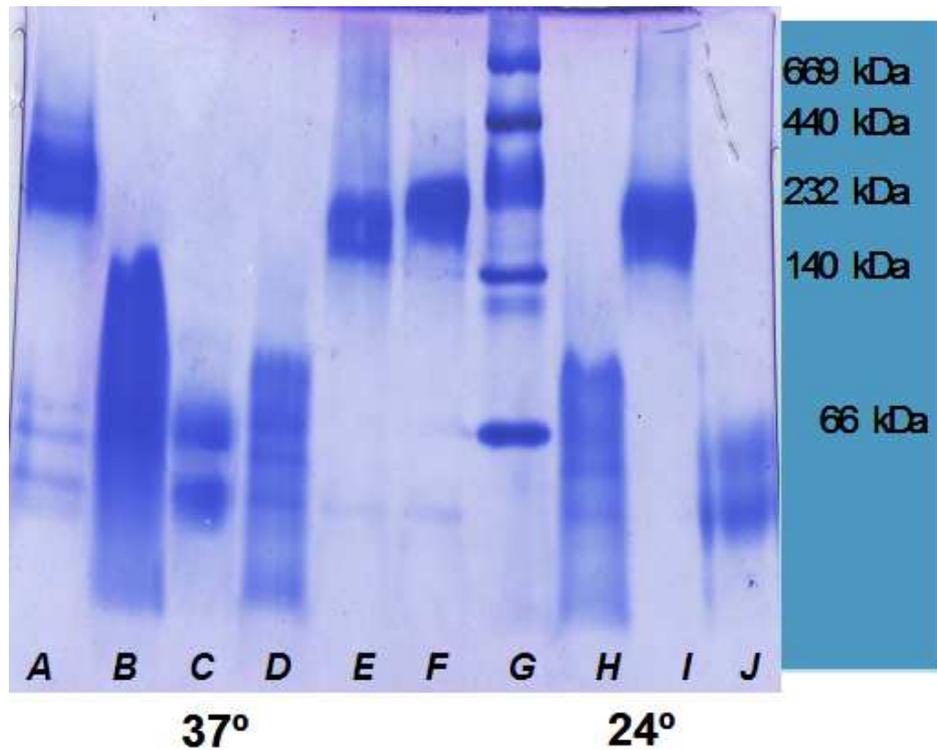


Figura 58. Productos de las reacciones de micelización de la figura 57 analizados por PAGGE en condiciones no denaturalizantes. Calles A y F:10% PI (37 y 24°C). Calle B: ApoA-I sin lípidos. Calles C y J: 100% PI (37 y 24°C). Calles D y H: 50% PI (37 y 24°C). Calles E e I: 0% PI (37 y 24°C). Calle G: estándares peso molecular.

Las vesículas preparadas con una mezcla equimolar de DMPC y PI no fueron micelizadas o microsolubilizadas por apoA-I. Las bandas proteicas que se observan en el gel son muy similares a las encontradas para apoA-I sin lípidos, que forma una serie de oligómeros (dímeros a tetrámeros o mayores agregados dependiendo de la concentración), aunque no puede descartarse la unión de cantidades discretas de lípidos.

Las vesículas con 100% PI, en cambio, que son microsolubilizadas a una velocidad apreciable por la disminución de turbidez que es más efectiva a 37 que a 24°C, originan dos productos de tamaños muy similares al monómero y dímero de apoAI (30 y 60 kDa, respectivamente). Por la disminución de turbidez, por el hecho de que se afecte el equilibrio de oligomerización de la proteína (comparar la calle B con las calles C y J del gel de la figura 58), y por el tamaño de los productos resultantes, podemos concluir que apoA-I es lipidada al ser mezclada con vesículas de 100% PI, pero uniendo sólo cantidades discretas de PI sin llegar a formar grandes complejos dHDL como los

formados con DMPC sólo o DMPC con 10% de PI.

Mediciones con mezclas de DMPC y PS de cerebro porcino (resultados no mostradas) dieron resultados similares a los obtenidos con PI, indicando que los fosfolípidos ácidos pueden reaccionar con apoA-I en el estado líquido-cristalino pero generan complejos que unen cantidades discretas de lípidos.

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las dHDL son complejos minoritarios en la circulación, pero constituyen intermediarios claves en el proceso del transporte reverso del colesterol. Los mismos son generados por la lipidación de apoA-I en la membrana celular para lo que se requiere la acción del transportador ABCA1 (ATP binding cassette A1), cuya deficiencia es la causa de la enfermedad de Tangier (90) que se caracteriza por complicaciones cardiovasculares prematuras. Mediante la hidrólisis de ATP, ABCA1 impulsa la traslocación de fosfolípidos desde la capa interna a la externa de la membrana (91). Se ha propuesto (Vedhachalam C, et al 2007 (92)), que esto genera defectos de empaquetamiento que permiten la generación de dHDL por un mecanismo similar a la formación espontánea de complejos con DMPC. Una vez formadas, las dHDL pueden captar colesterol desde la membrana celular por varios mecanismos (Adorni MP, et al 2007 (93)) como el transporte activo mediado por ABCG1 (otro miembro de la familia ABC), el transporte facilitado mediado por SR-BI (scavenger receptor BI), e incluso la difusión simple no mediada por proteínas de membrana pero que como se propuso en este laboratorio puede ser facilitada por el anclaje de las dHDL a la membrana a través del par de hélices 3-4 de apoA-I (Garda HA, 2007;(94)). Una vez enriquecidas en colesterol, las dHDL son sustrato de la enzima lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT) que forma ésteres de colesterol transfiriendo un ácido graso desde fosfatidilcolina, generando así el núcleo hidrofóbico de las HDL esféricas maduras que son mayoritarias en la circulación. Diferentes procesos como la captación selectiva de ésteres de colesterol en hígado mediada por el SR-BI, intercambio de lípidos y apolipoproteínas con otras lipoproteínas plasmáticas, y lipólisis, generan nuevamente apoA-I libre o pobre en lípidos que reinicia el ciclo de captación lipídica vía ABCA1 en los tejidos periféricos

A pesar del gran esfuerzo invertido por muchos grupos de investigación en todo el mundo, aún no se tiene una comprensión cabal del funcionamiento de apoA-I en el transporte reverso de colesterol y otros procesos relacionados a la antiaterogenicidad de esta proteína. Esto es en gran parte debido a la carencia de información estructural tanto de la proteína libre como de sus complejos con lípidos. Debido a la gran heterogeneidad y la baja proporción de las dHDL en suero, es extremadamente dificultoso su aislamiento en cantidades y pureza adecuados para determinaciones estructurales y otros estudios. Por tal razón, la mayoría del conocimiento sobre las dHDL proviene de estudios con dHDL reconstituidas artificialmente. Uno de los métodos usados para la reconstitución de dHDL es la microsolvubilización espontánea de vesículas de fosfolípidos en la temperatura de transición de fase gel/líquido-cristalino (T_t), llamado aquí método SC. Este método tiene la ventaja de que probablemente ocurra por un mecanismo similar a la lipidación "in vivo" de apoAI (92), pero está restringido sólo a algunos fosfolípidos con T_t accesible y compatible con muestras biológicas como DMPC o DPPC. El otro método de reconstitución que puede ser aplicado con cualquier tipo de fosfolípidos o mezclas de lípidos, es hacer complejos micelares de la proteína y lípidos con un detergente dializable como colato. Luego de eliminar el colato por diálisis, los fosfolípidos y apoAI se auto-ensamblan en complejos dHDL (Jonas A, 1989(95)). Este método (aquí denominado CC) es el que más se ha utilizado en estudios estructurales y funcionales. Las partículas dHDL mejor caracterizadas son aquellas conteniendo 2 moléculas de apoAI y unas 100 moléculas de POPC. Aunque varios modelos han sido propuestos, el de mayor sustento experimental es el denominado del "doble cinturón" (56), basado en gran parte en la estructura cristalina de apoAI(Δ 1-43) (56). Este consiste de un segmento de bicapa lipídica en forma de disco, rodeado por un doble cinturón formado por las hélices anfipáticas de dos moléculas de apoAI dispuestas de manera antiparalela y extendida. El detalle de la organización de las hélices ha sido explorado en las dHDL CC a través del uso de agentes entrecruzantes de lisinas, seguida de clivaje proteolítico y análisis de los péptidos resultantes por espectrometría de masa (96, 97,98). Los entrecruzamientos encontrados son consistentes con la presencia

mayoritaria del arreglo denominado LL5/5, en el que las hélices 5 de cada molécula de apoAI se encuentran yuxtapuestas entre sí. Sin embargo, también se detectaron en menor proporción varios entrecruzamientos que indican la coexistencia de un segundo arreglo (LL5/2) en el que la hélice 5 de una molécula de apoAI queda yuxtapuesta con la hélice 2 de la otra molécula (ver Figura 22). La coexistencia de arreglos alternativos en dHDL CC fue también detectada por FRET con mutantes marcadas con grupos fluorescentes tanto en el caso de apoAI (Tricerri MA, et al 2001(99). Li HH, et al 2002 (100).) Como con apo Lp III de insectos (Garda HA, et al 1982 (85)).

En este trabajo de tesis, sin embargo, hemos obtenido evidencias fehacientes de que en las dHDL SC el arreglo o configuración de las moléculas de apoAI es diferente al que resulta en las dHDL CC. Estos resultados concuerdan con evidencias previas de este laboratorio (Prieto ED. Rol de un dominio central de apolipoproteína A-I en la interacción de lipoproteínas de alta densidad con membranas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata; 2008.) Como el hecho de que el patrón de péptidos obtenido por RP-HPLC o MALDI-TOF del producto de tripsinólisis luego del entrecruzamiento covalente de lisinas con el agente DSP, difiere entre las dHDL SC y CC. Además, mediante el uso de mutantes de único residuo triptófano en la hélice 4 (W@104 y W@108), se encontró una mayor eficiencia de homo-transferencia de energía Trp-Trp y de auto-extinción de la fluorescencia en las dHDL SC que en las CC. En aquel trabajo, sin embargo, no se habían podido estimar fehacientemente las distancias intermoleculares Trp-Trp. En el presente trabajo, en cambio, a través del uso de tres mutantes de cisteína (K107C, K133C y K226C) marcadas específicamente con derivados maleimilados de diferentes fluoróforos (y usando determinaciones de autoextinción, homo-FRET y hetero-FRET) se pudieron estimar con bastante precisión las distancias intermoleculares 107-107, 133-133 y 226-226 en los dos tipos de preparaciones de dHDL (SC y CC). Las distancias intermoleculares obtenidas con estas mutantes (que fueron específicamente diseñadas para detectar las configuraciones alternativas 5/5 y 5/2) soportan la

hipótesis de que la configuración predominante en las dHDL CC es la 5/5 y que la configuración predominante en las dHDL SC es la 5/2.

En la tabla IV-1 se resumen todas las distancias estimadas por homo- o hetero-FRET en los dos tipos de dHDL. Como referencia de la configuración LL5/5, también se indican las distancias intermoleculares entre los C α de los pares de residuos 107-107, 133-133 y 226-226 de los dímeros de la estructura cristalina de apoA Δ 1-43 que presenta esta configuración. Como referencia aproximada de la configuración 5/2, se dan los valores que surgen de desplazar en 5 nm a una de las moléculas de apoA-I respecto de la otra para yuxtaponer a ambas hélices 5 con las hélices 2.

Residuos	Conf 5/5 cristal ^a	dHDL CC			
		Ho A350 ^c	He A350/488 ^d	He A350/647 ^e	Ho A488 ^f
107-107	6,4	> 2,2	3,9	3,2	ND ^g
133-133	1,4	0,7-0,8	< 2,2	1,5	ND
226-226	2,9	1,5-1,7	4,4	3,4	ND
	Conf 5/2 estimado ^b	dHDL SC			
		Ho A350 ^c	He A350/488 ^d	He A350/647 ^e	Ho A488 ^f
107-107	1,4	0,8-0,9	< 2,2	< 1,4	≤ 2,5
133-133	6,4	1,6-1,8	5,1	4,1	4,2 - 4,8
226-226	2,1	1,5-1,7	4,0	2,8	≤ 2,5

Tabla IV-1. Distancias intermoleculares (en nm) entre los residuos 107-107, 133-133 y 226-226 determinadas por homo- y hetero-FRET en las dHDL CC y SC, comparadas con las distancias esperadas para las configuraciones 5/5 y 5/2.

^a Distancias entre los C α obtenidas de las coordenadas de la estructura cristalina de apoA-I Δ 1-43.

^b Distancias entre los C α estimadas partiendo de la estructura cristalina y suponiendo un desplazamiento de 5 nm de un monómero de apoA-I respecto del otro para yuxtaponer ambas hélices 5 con las hélices 2.

^c Distancias obtenidas por homo-FRET con Alexa-350

^d Distancias obtenidas por hetero-FRET de Alexa-350 a Alexa-488

^e Distancias obtenidas por hetero-FRET de Alexa-350 a Alexa-647

^f Distancias obtenidas por homo-FRET con Alexa-488

^g ND = no determinado

Salvo en el caso de homo-FRET con Alexa-350 que reportó distancias más cortas, hubo una aceptable concordancia entre las distancias determinadas por las diferentes sondas o pares de sondas. Por el tamaño considerable de los grupos fluorescentes, la distancia entre los mismos podría diferir en hasta 2 nm de aquella entre los C α de los residuos cisteína a los que se encuentran unidos. Teniendo esto en cuenta, las distancias 133-133 y 226-226 estimadas por FRET en las dHDL CC concuerdan muy bien con las de la estructura cristalina de apoA-I Δ 1-43 que presenta la configuración LL5/5. La distancia más corta encontrada para 107-107 especialmente por hetero-FRET de Alexa-350 a Alexa-647 (en comparación con la distancia entre esos residuos en el cristal) podría ser explicada en parte por el gran tamaño del grupo aceptor Alexa-647, pero también por la presencia de una menor proporción de dHDL con la configuración 5/2 en coexistencia con una proporción mayoritaria de dHDL con configuración 5/5, como ha sido detectado por el grupo de S. Davidson usando agentes entrecruzantes de lisina (59).

En el caso de las dHDL SC, existe una buena concordancia entre las distancias estimadas por FRET con aquellas esperadas para la configuración 5/2, salvo en el caso de homo-FRET con Alexa-350 que tendió a reportar distancias más cortas que las esperadas. En todos los casos, sin embargo, se mantuvo la tendencia de incrementarse la distancia para 133-133 al pasar de dHDL CC a dHDL SC, mientras que lo contrario ocurrió para la distancia 107-107 y no ocurrieron grandes cambios para la distancia 226-226. Así, aunque no puede descartarse la coexistencia de otras configuraciones, los datos indican que las dHDL SC presentan mayoritariamente la configuración 5/2.

La detección del fenómeno de autoextinción de la emisión de Alexa-350 (entre los residuos 107-107 en las dHDL SC y entre 133-133 en las dHDL CC) también indicó que las dHDL SC presentan mayoritariamente la configuración 5/2 contrariamente a las dHDL CC que presentan la configuración 5/5 como mayoritaria.

La reacción de micelización o microsolvubilización espontánea en la Tt es atribuida a la coexistencia de dominios lipídicos en estado fluido y estado gel en cuyas interfases se generan defectos de empaquetamiento lipídico donde procede la reacción. La cinética de la reacción de microsolvubilización de vesículas fosfolipídicas en la Tt por apoA-I y otras apolipoproteínas intercambiables es de segundo orden y consiste de dos fases simultáneas (Segall ML et al ,2002 (102)), por lo que se propusieron dos tipos diferentes de sitios de unión (con o sin defectos de empaquetamiento de los lípidos) para apoAI en la superficie de la vesícula. Si la unión ocurre en los defectos, la reacción procede directamente. En cambio, la unión inicial a sitios sin defectos requiere de la difusión de apoAI sobre la superficie de la bicapa hasta encontrar un defecto dando origen a la fase lenta. En cualquier caso se requiere la unión inicial de apoA-I a la superficie de la bicapa, lo que es un proceso reversible. La conversión en dHDL, en cambio, es irreversible.

Por otro lado, en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que el estado unido a membranas de vesículas fosfolipídicas es esencialmente dimérico (Toledo JD, et al 2004 (60)), y ocurre con la inserción profunda en la bicapa del par de hélices centrales 3-4 (Córsico B, et al 2001 (102); Prieto ED, et al 2011), contrariamente al resto de las hélices que interactúan más superficialmente con la membrana. La determinación de la topología de inserción de esta región de apoAI llevó a proponer un modelo en el que un ramillete intermolecular formado por los dos pares de hélices 3-4 de un dímero penetra una de las monocapas de la membrana. La particular distribución de los residuos cargados en las caras polares de estas hélices anfipáticas (tipo Y) permitiría la estabilización del ramillete por puentes salinos. La dimerización de apoA-I en solución acuosa también parece ocurrir a través de interacciones entre estos pares de hélices 3-4, aunque en este caso a través de las caras hidrofóbicas (Prieto ED, et al 2011 (77)). Así, la dimerización de apoA-I a través de la interacción intermolecular entre los pares de hélices 3-4 de cada monómero (ya sea antes o después de la unión a membrana) puede condicionar la configuración final de las dHDL generadas por la reacción de microsolvubilización espontánea, cuyas moléculas de apoA-I quedarían alineadas o

yuxtapuestas en la región de las hélices 3-4 y por lo tanto en la configuración 5/2 (ver figura 22).

Para la formación de las micelas mixtas de apoA-I/fosfolípido/colato, en cambio, no se requeriría la formación previa del dímero de apoA-I. A medida que se va eliminando el detergente, las hélices de apoA-I lo reemplazarían cubriendo el borde hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica del disco. El factor determinante de las interacciones interhélices y por tanto de la configuración final 5/5 en las dHDL generadas de esta manera sería la maximización de puentes salinos como ocurre en el cristal de apoA-I Δ 1-43 y fuera propuesto por Segrest (Segrest JP, et al 1999 (56)) en el desarrollo del modelo del "doble cinturón".

El hecho de que ambas configuraciones (5/5 y 5/2) puedan ser generadas por procedimientos independientes implica que existe una barrera termodinámica que impide la interconversión entre las mismas. Al respecto, en experimentos de dinámica molecular partiendo de configuraciones muy parecidas a la del cristal de apoA-I Δ 1-43, pero que diferían en una vuelta de hélice en su alineación inicial (G129/G129 o K133/K1333), se observó en ambos casos la ruptura y reformación de puentes salinos en una escala temporal de unos 100 ps permitiendo la rotación unidireccional de una molécula de apoAI respecto de la otra (Klon AE et al 2002(103)). Pero en el caso de K133/K133, la rotación se detuvo cuando los residuos de prolina de ambas moléculas (que se hallan regularmente espaciados e la secuencia) quedaron yuxtapuestos. El doble cinturón proteico, inicialmente circular, adquirió entonces una forma hexagonal con tramos de hélices rectos interrumpidos en los pares de prolinas apiladas. Se propuso que esta yuxtaposición de los residuos de prolina serían de importancia para la configuración final adoptada por las dos moléculas de apoAI en las dHDL y los autores consideraron que en base a esto la más estable sería aquella en que la hélice 5 de una molécula se enfrenta con la hélice 6 de la otra (configuración 5/6). Sin embargo, no se han hecho simulaciones con otras configuraciones de partida como la 5/2.

Como fue propuesto por el grupo de Phillips (Vedhachalam C, et al 2007 (92), Lund-Katz S, et al 2010 (61)), el mecanismo de formación de las dHDL nacientes

mediado por ABCA1 ocurriría por un mecanismo básicamente similar al que ocurre con vesículas de DMPC. ApoA1 se une a ABCA1, pero esto no resulta directamente en la generación de las dHDL nacientes sino que sirve como un disparador de sistemas de señalización que entre otros efectos resulta en la estabilización y consecuente aumento de la actividad del transportador/receptor. Como consecuencia de la actividad traslocadora de fosfolípidos (flipasa) desde la capa interna a la externa de la membrana esta última queda más poblada en fosfolípidos, lo que crea una tensión que genera regiones de gran curvatura y defectos de empaquetamiento. Así, de esta manera se crean sitios similares a los que se producen en la Tt de una vesícula fosfolipídica, a los que se une apoA1 produciendo la microsolvubilización de la membrana y generando las dHDL nacientes. Por tanto, es muy probable que las dHDL fisiológicas generadas por la acción de ABCA1 posean la misma configuración (5/2) que las dHDL SC generadas por la reacción con DMPC a 24°C.

En este trabajo de tesis también se estudió la posible implicancia fisiológica de las configuraciones alternativas generadas por ambos métodos de reconstitución, a través de mediciones de la capacidad de remover colesterol de cultivos celulares. Se usaron para ello macrófagos murinos cargados con colesterol y previamente estimulados con un análogo permeable de cAMP (8-Br-cAMP) para estimular la expresión de los transportadores ABC. Los resultados indicaron que al menos a bajas concentraciones (< 8 ug/ml de apoA-I), las dHDL SC son más activas que las dHDL CC para remover colesterol de estas células. A diferencia de la actividad de las dHDL SC que presentó una dependencia hiperbólica de la concentración, la actividad de las dHDL CC presentó una dependencia sigmoidea alcanzando a altas concentraciones una actividad similar o incluso algo mayor que la de las dHDL SC. Aunque se desconoce la razón exacta de este comportamiento diferente, el mismo podría atribuirse en principio a la diferente configuración de la apoA-I dimérica (5/5 o 5/2) en ambos tipos de preparaciones de dHDL.

Como se mencionó, los mecanismos de remoción de colesterol celular mediados por apoA-I y HDL son variados, dependiendo algunos de la actividad de proteínas de transporte celulares (como ABCA1, ABCG1 y SR-BI) y otros que son

independientes de proteínas celulares. La configuración de las moléculas de apoA.I en las dHDL puede ser importante tanto para la interacción y reconocimiento de proteínas celulares, como para la interacción directa con la membrana lipídica. Se ha demostrado en trabajos previos (Tricerri A, et al 1998; Tricerri MA, et al 2002 (99, 100)), que las dHDL, en especial aquellas de menor tamaño y libres de colesterol, presentan la capacidad de unirse a membranas fosfolipídicas. Tanto apoA-I como las dHDL inducen pérdida del contenido acuoso de vesículas fosfolipídicas, lo que fue atribuido a la transitoria desestabilización de la bicapa lipídica debido a la probable inserción en la membrana de algún segmento o región de la proteína. Posteriormente, se identificó a esa región como la correspondiente al par de hélices central 3-4, ya que es exclusivamente marcada cuando apoAI libre o dHDL son incubadas con vesículas que contienen un análogo fosfolipídico fotoactivable (Córsico B, et al 2001(101)). Así, es muy probable que el ramillete intermolecular del par de hélices centrales 3-4, que se propuso para la interacción de apoAI libre con membranas (Prieto ED, Garda HA 2011; 50 (77)), también sea funcional en el caso de la interacción de dHDL con membranas. Como la capacidad de interactuar con membranas disminuye al incrementar el tamaño (o contenido de fosfolípidos) y el contenido de colesterol de las dHDL (64, 65.), y estos factores modifican la conformación de la región central disminuyendo su grado de exposición, también se ha propuesto que la formación del dominio de inserción activo podría ser dificultada en dHDL grandes y ricas en colesterol (94).

Con un péptido sintético que abarca la secuencia de este par de hélices (AI 77-120), se obtuvieron evidencias de que esta región se comporta como un dominio estructural y funcionalmente independiente del resto de la molécula de apoAI y que podría cumplir un rol importante en varias funciones de apoAI (Toledo JD, et al 2004 (60)). En cuanto a sus propiedades estructurales, AI 77-120 presenta un considerable contenido de hélice (23%) para un péptido de 44 residuos. Su unión a membranas ocurre sin grandes cambios en la estructura secundaria, pero con modificación de su estructura cuaternaria: es esencialmente monomérico en solución acuosa, pero tetramérico en el estado unido a membrana. Al igual que

apoAI y las dHDL, este péptido es marcado por el análogo fosfolipídico fotoactivable 125I-TID-PC, y presenta selectividad para unirse a membranas ricas en colesterol por las que presenta mayor afinidad y capacidad de unión en comparación con membranas sin colesterol. Su afinidad por membranas es 10 veces menor que para apoAI libre, pero es del mismo orden que presentan las dHDL de 78 Å, lo que puede ser explicado por la contribución de las otras hélices a la interacción apoAI/membrana. Esta relativamente baja afinidad sería importante para producir un anclaje reversible a la membrana.

La velocidad de intercambio de colesterol entre dHDL y vesículas lipídicas se correlaciona con la capacidad de interacción (Toledo JD, et al 2000 (65)), indicando que el anclaje de los discos a la membrana facilita o cataliza el intercambio de colesterol. Al respecto, se determinó que tanto apoAI como el péptido AI 77-120 pueden promover la desorción de colesterol desde membranas fosfolipídicas como se detectó usando un análogo fluorescente de colesterol (dehidroergosterol) o con colesterol radio-marcado (Toledo JD, et al 2004 (60)). Como la desorción es la etapa limitante en el intercambio de colesterol, el mismo sería facilitado por el anclaje de dHDL a la membrana mediante la inserción del par central de hélices Y.

Es de mencionar que todos estos estudios fueron llevados a cabo en dHDL reconstituidas por diálisis de colato; y que entre los dos tipos de arreglos configuracionales (LL5/5 o LL5/2) que han sido detectados en estos complejos lipoproteicos, sólo en el caso del arreglo LL5/2 estos pares de hélices estarían lo suficientemente cercanos entre sí para permitir la formación del ramillete intermolecular. Así, es altamente probable que la mayor actividad de las dHDL SC en comparación con las dHDL CC para remover colesterol de macrófagos que se detectó en este trabajo (al menos a bajas concentraciones de dHDL) pueda ser debida a que las mismas presentan preferencialmente la configuración 5/2 que permite la formación del ramillete intermolecular de las hélices 3-4 y el anclaje a la membrana.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

En vista de que en este trabajo se demostró que la configuración de apoA-I en dHDL reconstituidas artificialmente depende del método utilizado, surgen las preguntas a) ¿Cuál de estas configuraciones es la adoptada por la proteína en las dHDL naturales generadas por células? y b) ¿Cuál/es de los métodos de reconstitución reproduce mejor la configuración y propiedades de las dHDL naturales?.

En principio, y de acuerdo a la similitud propuesta con los mecanismos de generación de dHDL por células mediada por ABCA1, la reacción espontánea con vesículas fosfolípídicas en la Tt generaría dHDL con la configuración natural; pero esto necesita ser confirmado. Además, este método requiere del uso de fosfolípidos saturados (DMPC o DPPC) que tienen propiedades muy diferentes de los fosfolípidos insaturados más fisiológicos como POPC.

Así, dos cuestiones centrales a resolver en el futuro son a) la determinación de la configuración de apoA-I en las dHDL naturales y b) la disponibilidad de un método de reconstitución que reproduzca esta configuración además de las propiedades de las dHDL naturales.

El uso de proteínas mutantes marcadas con grupos fluorescentes o paramagnéticos podría ser de gran utilidad en ese sentido, para tratar de determinar la configuración de dHDL generadas por la interacción de estas proteínas marcadas con cultivos celulares. El acoplamiento spin-spin, por ejemplo, podría ser detectado en muy bajas concentraciones y sin interferencias de otras proteínas, por lo que sería una estrategia en principio promisoría para alcanzar este objetivo. Algunos experimentos preliminares con EPR ya fueron presentados aquí, pero se requiere la mejor puesta a punto de la metodología en sistemas reconstituidos antes de su utilización en dHDL generadas por células. Los métodos de FRET usados en este trabajo requieren del uso de la mezcla de dos proteínas (marcadas con donador o aceptor, o marcada y no marcada). Por la distribución binomial esperada, la interpretación de los datos puede ser extremadamente compleja en las dHDL generadas por células por su heterogeneidad y presencia de dHDL con tres o más moléculas de apoA-I. Sin

embargo, el hecho de que las configuraciones alternativas 5/5 y 5/2 resulten en la aparición de autoextinción de la emisión de Alexa-350 abre la posibilidad del uso de otros fenómenos que también dependen de la colisión entre grupos fluorescentes pero que son más fácil de detectar como la formación de dímeros excitados o excímeros. La eficiencia de formación de exímero de pireno, por ejemplo, puede determinarse directamente del espectro de emisión de la relación de intensidad entre las bandas correspondientes a la emisión del monómero y del excímero. Por tanto, no se requeriría de mezclas con la proteína no marcada ni de la exacta cuantificación de la concentración proteica por lo que en principio sería altamente ventajoso para encarar estudios con dHDL generadas por células.

En este trabajo, también se presentaron algunos resultados tendientes a conocer los requerimientos de la reacción espontánea de microsolubilización de vesículas fosfolípídicas (en cuanto a la influencia de fosfolípidos cargados). Actualmente, se están realizando experimentos de microsolubilización de vesículas de POPC en medios levemente ácidos, que parecen promisorios en la generación espontánea de dHDL con este fosfolípido insaturado. Experimentos de este tipo, tendientes a generar dHDL que reproduzcan las propiedades de las dHDL naturales serán continuados en el futuro.

7. REFERENCIAS

1. Mackay J, Mensah G, The Atlas of Heart Disease and stroke : WHO, 2004.
2. Glass C, Witztum J. Atherosclerosis. The road ahead. Cell 2001 ;104 :503-516.
3. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002 ; 420 :868-874.
4. Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J med 2005 ; 352 :1685-1695.
5. Michiels C. Endothelial cell functions. J Cell Physiol 2003,196 :430-443.
6. Dvies M, Woolf N, Rowles P, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. Br Heart J 1988 ; 60 459-464.
7. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 2006 ; 47 : C7-12.
8. Kragel A, Ressay S, Wittes j, Roberts W. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. Circulation 1989 ; 80 :1747-1756.
9. Schwartz S, Virmani R, Rosenfeld M. The good smooth muscle cells in the atherosclerosis. Curr atheroscler Rep 2000 ; 2 :422-429.
10. Beckman J, Ganz J, Creager M, Ganz P, Kinlay S. Relationship of clinical presentation and calcification of culprit coronary artery stenoses. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001 ; 21 :1618-1622.
11. Kolodgie F, Gold H, Burke A, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. N Engl J Med 2003 ;349 : 2316-2325.
12. Virmani R, Kolodgie F, Burke A, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture : angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005 ; 25 :2054-2061.
13. Singh R, Mengi S, Xu Y, Arneja A, Dhalla N. Pathogenesis of atherosclerosis : A multifactorial process. Exp Clin Cardiol 2002 ; 7 :40-53.
14. Stary Hc, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on Vascular Lesions of the council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler

- Thromb 1994 ;14 :840-856.
15. Stary H, Chandler A, Dinsmore R, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arterosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995,92 :1355-1374.
 16. Virchow R, *Celluar Pathology as Based upon Physiological and pathological Histology*. London : John Churchill, 1860.
 17. Kannel W, Mc Gee D. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979 ;241 :2035-2038.
 18. Steinberg D. Thematic review series : the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V : the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipids Res* 2006 ;47 :1339-1351.
 19. Expert Panel on Detction E, and Treatment of High Blood Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evalution, And Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001 ; 285 :2486-2497.
 20. Dobrin P. Mechanical Factors associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure. A model of arteries exposed to hypertension. *Hypertension* 1995 ;26 :38-43.
 21. Gibbons G, Pratt R, Dzau V. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. Hiperplasia. Autocrine transforming growth factor –beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992 ; 90 :456-461.
 22. Griending K, Alexandre R. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997 ; 96 : 3264-3265.
 23. Lacy F, O´connor D, Schmid- Schönbein G. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998 ; 16 :291-302.
 24. Kabagambe E, Ordovas J, Tsai M, et al. Smoking, inflamatory patterns and pospandrial hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2009 ;203 :633-639.
 25. Glantz S, Parmeley W. passive smoking and heart disease. Mechanisms and risk. *JAMA* 1995 ; 273 :1047-1053.

26. Bazzano L, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton P. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med* 2003 ; 138 :891-897.
27. Weitz J, Crowley K, Landman S, Lipman B, Yu J. Increased neutrophil elastase activity in cigarette smokers. *Ann Intern Med* 1987 ;107 :680-682.
28. Celermajer D, Sorensen K, Gooch V, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992 ;340 :1111-1115.
29. Tracy R, Toca V, Strong J, Richards M. Relationship of raised atherosclerotic lesions to fatty streaks in cigarette smokers. *Atherosclerosis* 1981 ; 38 :347-357.
30. Zieske A, McMahan C, McGill HJ, et al. Smoking is associated with advanced coronary atherosclerosis in youth. *Atherosclerosis* 2005 ;180 :87-92.
31. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care* 1997 ;20 :1183-1197.
32. Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus : insights from mechanistic studies. *Lancet* 2008 ;371 :1800-1809.
33. Haffner S, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998 ; 339 :229-234.
34. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes . *N Engl J Med* 2008 ; 358 :2560-2572.
35. Keranney P, Blackwell L, Collins R, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18, 686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins : a meta-analysis. *Lancet* 2008 ; 371-125.
36. Ayyobi A, McGladdery S, McNeely M, Austin M, Motulsky A, Brunzell J. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 ;23 :1289-1294.
37. Goldberg I. Clinical review 124 : Diabetic dyslipidemia : causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86 :965-971.

38. Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA, Oliveira J. Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation. *Int J Cardiol* 2012 ;141 :214-221.
39. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003 ; 107 :3152-3158.
40. Taylor RS, Brown A, Ebrahim S, et al. Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease : systematic review and meta-analysis of randomized acontrolled trials. *Am J Med* 2004 ; 116 :682-692.
41. Walther C, Möbius-Winkler S, Linke A, et al . Regular exercise training compared with percutaneous intervention leads to a reduction of inflammatory markers and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc prev Rehabil* 2008 ;15 :107-112.}
42. Poirier P, Giles T, Bray G, et al. Obesity and cardiovascular disease : pathophysiology, evaluation and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ; 26 :968-976.
43. Ogawa K, Ueda K, Sasaki H, et al. History of obesity as a risk factor for both carotid atherosclerosis and microangiopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2004 ; 66 suppl 1 :S165-168.
44. Zimmet P, Alberti K, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001 ; 414 :782-787.
45. Eckel R, Grundy S, Zimmet P. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005 ;365 :1415-1428.
46. Pasceri V, Willerson J, Yeh E. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 200 ;102 :2165-2168.
47. Makita S, Nakamura M, Hiamori K. The association of C-reactive protein levels with carotid intima-media complex thickness and plaque formation in the general population. *Stroke* 2005 ; 36 :2138-2142.
48. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 21, 13-27, 2001.
49. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2, 399-406, 2000.
 50. Fielding CJ, Fielding PE. Cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1533, 175-89, 2001.
 51. Yokoyama S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta* 1529, 231-44, 2000.
 52. Krimbou L, Hajj Hassan H, Blain S, Rashid S, Denis M, Marcil M, Genest J. Biogenesis and speciation of nascent apoA-I-containing particles in various cell lines. *J Lipid Res* 46, 1668-77, 2005.
 53. Ajees AA, Anantharamaiah GM, Mishra VK, Hussain MM, Murthy HM. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2126-31, 2006.
 54. Borhani DW, Rogers DP, Engler JA, Brouillette CG. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12291-6, 1997.
 55. Garda HA, Arrese EL, Soulages JL. Structure of apolipoprotein III in discoidal lipoproteins. Interhelical distances in the lipid-bound state and conformational change upon binding to lipid. *J Biol Chem* 277, 19773-82, 2002.
 56. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 33, 141-66, 1992.
 57. Klon AE, Segrest JP, Harvey SC. Comparative models for human apolipoprotein A-I bound to lipid in discoidal high-density lipoprotein particles. *Biochemistry* 41, 10895-905, 2002.
 58. Tricerri, MA, Behling Agree AK, Sanchez SA, Bronski J, Jonas A. Arrangement of apolipoprotein AI in reconstituted high-density lipoprotein disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments. *Biochemistry* 40, 5065-74. 2001.

59. Silva RA, Hilliard GM, Li L, Segrest JP, Davidson WS. A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins. *Biochemistry* 44, 8600-7, 2005.
60. Toledo JD, Prieto ED, Gonzalez MC, Soulages JL, Garda HA. Functional independence of a peptide with the sequence of human apolipoprotein A-I central region. *Arch Biochem Biophys* 428, 188-97, 2004.
61. Duong PT, Collins HL, Nickel M, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J Lipid Res* 47, 832-843, 2006.
62. Surewicz WK, Epand RM, Pownall HJ, Hui SW. Human apolipoprotein A-I forms thermally stable complexes with anionic but not with zwitterionic phospholipids. *J Biol Chem* 261, 16191-7, 1986.
63. Corsico B, Toledo JD, Garda HA. Evidence for a central apolipoprotein A-I domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 276, 16978-85, 2001.
64. Tricerri A, Corsico B, Toledo JD, Garda HA, Brenner RR. Conformation of apolipoprotein AI in reconstituted lipoprotein particles and particle -membrane interaction: effect of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1391, 67-78, 1998.
65. Toledo JD, Tricerri MA, Corsico B, Garda HA. Cholesterol flux between lipid vesicles and apolipoprotein AI discs of variable size and composition. *Arch Biochem Biophys* 380, 63-70, 2000.
66. Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJ. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* 299, 499-520, 2000.
67. Nolde DE, Sobol AG, Pluzhnikov KA, Grishin EV, Arseniev AS. Three-dimensional structure of ectatomin from *Ectatomma tuberculatum* ant venom. *J Biomol NMR* 5, 1-13, 1995.
68. Pluzhnikov KA, Nosyreva E, Shevchenko L, Kokoz Y, Schmalz D, Hucho F, Grishin E. Analysis of ectatomin action on cell membranes. *Eur J Biochem* 262, 501-6, 1999.
69. Oda MN, Forte TM, Ryan RO, Voss JC. The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger. *Nat Struct Biol* 10, 455-60, 2003.

70. Naber N, Rice S, Matuska M, Vale RD, Cooke R, Pate E. EPR spectroscopy shows a microtubule-dependent conformational change in the kinesin switch 1 domain. *Biophys J*. 84, 3190-6, 2003.
71. Moens, P. D., Helms, M. K., Jameson DM. Detection of tryptophan to tryptophan energy transfer in proteins. *Protein J* 23, 79-83, 2004.
72. Malmberg N, Falke JJ. Use of EPR power saturation to analyze the membrane-docking geometries of peripheral proteins: Applications to C2 Domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, 71-90, 2005.
73. Altenbach C, Greenhalgh DA, Khorana HG, Hubbell WL. A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 1667-71, 1994.
74. Ryan RO, Forte TM, Oda MN. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif* 27, 98-103, 2003.
75. Tricerri MA, Arnvig McGuire K, Tian SM, Jonas A. Folding and stability of the C-terminal half of apolipoprotein A-I examined with a Cys-specific fluorescence probe. *Biochim Biophys Acta*. 2002. 1594: 286-96).
76. Lakowicz, J.R., 1999, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press. Segunda Edición, 1-698.
77. Membrane insertion topology of the central apolipoprotein A-I region. Fluorescence studies using single tryptophan mutants. Prieto ED, Garda HA. *Biochemistry*. 2011. 50: 466-79.
78. Prieto ED, Ramella N, Cuellar LA, Tricerri MA, Garda HA. Characterization of a Human Apolipoprotein A-I Construct Expressed in a Bacterial System.. *Protein J*. 2012, en prensa.
79. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. Ryan RO, Forte TM, Oda MN. *Protein Expr Purif*. 2003. 27: 98-103
80. Leroy, A., Toohill, K.L., Fruchart, J.C., Jonas, A., 1993, Structural properties of high density lipoprotein subclasses homogeneous in protein composition and size, *J Biol Chem*, 268, 4798-805.
81. Gursky O, Atkinson D (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (7):2991-2995.

82. Martins IJ, Vilcheze C, Mortimer BC, Bittman R, Redgrave TG (1998) *J Lipid Res* 39 (2):302-312.
83. Theory and application of fluorescence homotransfer to melittin oligomerization. Runnels LW, Scarlata SF. *Biophys J.* 1995; 69(4):1569-83. 2) Dimer/monomer equilibrium and domain separations of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12.
84. Hamman BD, Oleinikov AV, Jokhadze GG, Traut RR, Jameson DM. *Biochemistry.* 1996; 35(51):16680-6.
85. Distance measurements by fluorescence energy homotransfer: evaluation in T4 lysozyme and correlation with dipolar coupling between spin labels. Zou P, Surendhran K, Mchaourab HS. *Biophys J.* 2007; 92(4):L27-9.
86. Effect of reconstituted discoidal high-density lipoproteins on lipid mobilization in RAW 264.7 and CHOK1 cells. Toledo JD, Cabaleiro LV, Garda HA, Gonzalez MC. *J Cell Biochem.* 2012; 113: 1208-16.
87. The central type Y amphipathic alpha-helices of apolipoprotein AI are involved in the mobilization of intracellular cholesterol depots. Gonzalez MC, Toledo JD, Tricerri MA, Garda HA. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473: 34-41.
88. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. Favari E, Calabresi L, Adorni MP, Jessup W, Simonelli S, Franceschini G, Bernini F. *Biochemistry.* 2009; 48: 11067-74.
89. Human apolipoprotein A-I forms thermally stable complexes with anionic but not with zwitterionic phospholipids. Surewicz WK, Epanand RM, Pownall HJ, Hui SW. *J Biol Chem.* 1986; 261: 16191-7.
90. Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2150-60.
91. Kang MH, Singaraja R, Hayden MR. Adenosine-triphosphate-binding cassette transporter-1 trafficking and function. *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20: 41-9).
92. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2007; 282: 25123-30).
93. Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, Rothblat GH. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res* 2007; 48: 2453-62

94. Garda HA. Structure-function relationships in human apolipoprotein A-I: Role of a central helix pair. *Future Lipidol* 2007; 2: 95-104.
95. Jonas A, Kézdy KE, Wald JH. Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. *J Biol Chem* 1989; 264: 4818-24.
96. Davidson WS, Silva RAG. Apolipoprotein structural organization in high density lipoproteins: Belts, bundles, hinges and hairpins. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 295-300.
97. Thomas MJ, Bhat S, Sorci-Thomas MG. The use of chemical cross-linking and mass spectrometry to elucidate the tertiary conformation of lipid-bound apolipoprotein A-I. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 214-20.
98. Silva RA, Hilliard GM, Li L, Segrest JP, Davidson WS. A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins. *Biochemistry* 2005; 44: 8600-7.
99. Tricerri MA, Behling Agree AK, Sanchez SA, Bronski J, Jonas A. Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments. *Biochemistry* 2001; 40: 5065-74.
100. Li HH, Lyles DS, Pan W, Alexander E, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG. ApoA-I structure on discs and spheres. Variable helix registry and conformational states. *J Biol Chem* 2002; 277: 39093-101.
101. Córscico B, Toledo JD, Garda HA. Evidence for a central apolipoprotein A-I domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 2001; 276: 16978-85.
102. Segall ML, Dhanasekaran P, Baldwin F, Anantharamaiah GM, Weisgraber K, Phillips MC, Lund-Katz S. Influence of apoE domain structure and polymorphism on the kinetics of phospholipid vesicle solubilization. *J Lipid Res* 2002; 43: 1688-700.
103. Molecular dynamics simulations on discoidal HDL particles suggest a mechanism for rotation in the apo A-I belt model. Klom AE, Segrest JP, Harvey SC. *J Mol Biol* (2002) 324, 703-21.