

**Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Emérito Dr. Rodolfo R. Brenner**

# Apolipoproteína A-I y lipoproteínas de alta densidad: Estructura y rol en la homeostasis del colesterol celular\*

*Apolipoprotein A-I and high density lipoproteins: Structure and role in cellular cholesterol homeostasis*

*Apolipoproteína A-I e lipoproteínas de alta densidade: Estrutura e papel na homeostase do colesterol celular*

- Horacio Alberto Garda<sup>1</sup>, Juan Domingo Toledo<sup>2</sup>, Marina Cecilia González<sup>3</sup>, Eduardo Daniel Prieto<sup>2</sup>, Luz Ángela Cuellar<sup>4</sup>, Laura Virginia Cabaleiro<sup>4</sup>, Lucio Alfonso Chirillano<sup>5</sup>, Carla Mariel Almeyra<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Dr. en Ciencias Químicas.

<sup>2</sup> Dr. en Bioquímica.

<sup>3</sup> Dra. en Ciencias Biológicas.

<sup>4</sup> Dra. de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

<sup>5</sup> Lic. en Biología.

<sup>6</sup> Estudiante de Biotecnología.

\* Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) CONICET-UNLP. Facultad de Ciencias Médicas. Calles 60 y 120, 1900 - La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

## Resumen

La apolipoproteína A-I (apoAI) es el componente proteico mayoritario de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuyo nivel sérico se correlaciona inversamente con el riesgo aterogénico. Las propiedades antiaterogénicas son atribuidas en gran parte al rol protagónico que tiene en el transporte reverso de colesterol (RCT), proceso que remueve el exceso de colesterol de los tejidos periféricos. La apoAI es una proteína anfitrópica formada casi en exclusividad por  $\alpha$ -hélices anfipáticas y presenta una gran flexibilidad conformacional que es crucial para su ciclo funcional, en el que se interconvierte entre diferentes estados: libre, unida a membranas, o a una gran variedad de complejos lipoproteicos de diferente tamaño, morfología y composición. En este reporte se revisa el conocimiento actual sobre la estructura y propiedades de interacción con lípidos de apoAI, en relación a la biogénesis de HDL y su función en el RCT. Se trata en particular la configuración de apoAI en HDL discoidales, así como la interacción con lípidos y la importancia para la remoción celular de colesterol de un par de  $\alpha$ -hélices anfipáticas que presentan una distribución particular de los residuos cargados y se localizan en el centro de la molécula de apoAI.

**Palabras clave:** apolipoproteína A-I \* lipoproteínas de alta densidad \* transporte reverso del colesterol \* lipoproteínas discoidales \*  $\alpha$ -hélices anfipáticas \* interacción lípido-proteica.

## Summary

*Apolipoprotein A-I (apoAI) is the major protein component of high density lipoprotein (HDL), whose serum level is inversely correlated with atherogenic risk. Antiatherogenic properties are largely attributed to its key role in re-*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

verse cholesterol transport (RCT), a process that removes cholesterol excess from peripheral tissues. ApoAI is an amphitropic protein that almost exclusively contains amphipathic  $\alpha$ -helices, and presents a large conformational flexibility that is crucial for its functional cycle, in which it inter-converts into different states: free or bound to membranes, or into a lipoprotein complex variety of different sizes, compositions and morphologies. This report reviews the current knowledge of the structure and lipid interaction properties of apoAI, in relation with HDL biogenesis and function in RCT. In particular, focus is made on the apoAI configuration in discoidal HDL; as well as on the interaction with lipids, and the importance for cellular cholesterol efflux, of an amphipathic  $\alpha$ -helix pair having a particular distribution of the charged residues and that locate at the center of the apoAI molecule.

**Key words:** apolipoprotein A-I \* high density lipoproteins \* reverse cholesterol transport \* discoidal lipoproteins \* amphipathic  $\alpha$ -helices \* lipid-protein interaction

## Resumo

Apolipoproteína A-I (apoAI) é o principal componente proteico das lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo nível sérico se correlaciona inversamente com o risco aterogênico. As propriedades antiaterogênicas são atribuídas, em grande parte, a seu papel principal no transporte reverso de colesterol (RCT), um processo que remove o excesso de colesterol dos tecidos periféricos. A ApoAI é uma proteína anfitrópica constituída quase exclusivamente por  $\alpha$ -hélices anfipáticas, e apresenta uma grande flexibilidade conformacional que é essencial para seu ciclo funcional, no qual se interconverte entre diferentes estados: livre, ligada a membranas ou a uma grande variedade de complexos lipoproteicos de diferente tamanho, morfologia e composição. Este relatório analisa o conhecimento atual sobre a estrutura e propriedades de interação com lipídios de apoAI, com relação à biogênese de HDL e sua função no RCT. Em particular, trata-se a configuração de apoAI em HDL discoidais; bem como a interação com lipídios e a importância para a remoção celular de colesterol de um par de  $\alpha$ -hélices anfipáticas que apresentam uma distribuição específica dos resíduos carregados e se localizam no centro da molécula de apoAI.

**Palavras-chave:** apolipoproteína A-I \* lipoproteínas de alta densidade \* transporte reverso de colesterol \* lipoproteínas discoidais \*  $\alpha$ -hélices anfipáticas \* interação lipídio-proteica

## I. Introducción

Una gran cantidad de estudios epidemiológicos y en animales transgénicos soportan la hipótesis de un rol protector de apolipoproteína A-I (apoAI) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) contra la arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares (1). Consistente con este rol es el hecho de que la infusión en pacientes de HDL sintéticas o péptidos miméticos de apoAI, retardan o incluso inducen la regresión de la placa arteriosclerótica (2). Estas patologías son una de las principales causas de mortalidad en el mundo (3) y uno de los principales factores que predisponen a las mismas son los desórdenes en el metabolismo de lipoproteínas (4). Entre éstos, la deficiencia de colesterol-HDL es la anomalía más frecuente.

Varias funciones conocidas de las HDL y apoAI contribuyen a su antiaterogenicidad. Entre ellas, sus demostradas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, vasodilatadoras, inmunosupresoras y antitrombóticas (5). Pero la mejor comprendida es la capacidad de remover el exceso de colesterol de células periféricas, incluidos

los macrófagos, y transportarlo hacia el hígado para su excreción, proceso que se denomina transporte reverso de colesterol (RCT) (6). La consecuente reducción de depósitos de colesterol de macrófagos evita su transformación en las células espumosas que se acumulan en la placa arteriosclerótica (7).

ApoAI, junto con las apolipoproteínas de los grupos C y E, se clasifica dentro del grupo de las denominadas apolipoproteínas intercambiables (8). Estas evolucionaron de un gen ancestral común y son estructuralmente similares. A diferencia de las apolipoproteínas de la clase B que se comportan similarmente a las proteínas integrales de membranas y no pueden solubilizarse en ausencia de detergentes, las apolipoproteínas intercambiables tienen un carácter anfitrópico. Son hidrosolubles en el estado libre de lípidos, pero al mismo tiempo tienen afinidad por superficies lipídicas, presentando así un equilibrio dinámico entre los estados libre y unido a lípidos (membranas o complejos lipoproteicos). Para ello se requiere de una gran flexibilidad o adaptabilidad conformacional que está dada por la presencia de varias  $\alpha$ -hélices anfipáticas unidas entre sí por regio-

nes flexibles. Esta revisión se referirá fundamentalmente a las propiedades estructurales de apoAI, los cambios conformacionales involucrados en la interacción con superficies lipídicas y la importancia de estos aspectos para su función en el RCT.

## II. Heterogeneidad y estructura básica de las HDL

Las HDL son generalmente aisladas por ultracentrifugación y se definen como la fracción lipoproteica de densidad entre 1,06 y 1,21 g/mL. Sin embargo, son un grupo muy heterogéneo de partículas que difieren en densidad, tamaño, morfología, carga superficial, y composición lipídica o apolipoproteica (9) (Tabla I). La gran mayoría de las partículas HDL detectadas en suero son de morfología esférica y migración electroforética  $\alpha$ . En estas, los lípidos neutros como ésteres de colesterol (CE) y triacilglicérols (TG) se particionan en un núcleo hidrofóbico, que es rodeado por una monocapa superficial formada por apolipoproteínas y fosfolípidos (PL). Los principales PL son aquellos derivados de la colina: fosfatidilcolinas (PC) y esfingomielinas (SM). El colesterol no esterificado (FC) se particiona entre el núcleo hidrofóbico y la superficie. En cuanto a las apolipoproteínas, apoAI constituye el 70% de las proteínas de HDL, seguida por un 20% de apoAII. El resto corresponde principalmente a apolipoproteínas de los grupos C y E.

También se detecta en suero una proporción minoritaria de HDL que carecen de lípidos neutros y por tanto del núcleo hidrofóbico. Al contener sólo lípidos anfipáticos, consisten de un fragmento de bicapa lipídica en forma de disco que es estabilizado en su borde por la apolipoproteína. Como se verá, estas HDL discoidales

(dHDL) son intermediarios claves en la biogénesis de las HDL esféricas maduras. Dependiendo de las células que las genera y el tipo de PL que contienen, las dHDL pueden tener migración  $\alpha$ , pre- $\alpha$  o pre- $\beta$  (10). También se detecta en suero una pequeña proporción de apoAI libre o combinada con cantidades discretas de lípidos (apoAI pobre en lípidos) que tiene migración pre- $\beta$ 1 a la que se le atribuye ser el receptor inicial del FC celular (9).

## III. Biosíntesis y secreción de apoAI

ApoAI es sintetizada en hígado e intestino como un precursor (pre-pro-ApoAI) que contiene una pre-secuencia y una pro-secuencia de 18 y 6 aminoácidos respectivamente. La pre-secuencia destina a la proteína al retículo endoplásmico donde es escindida por la peptidasa de señal. El hexapéptido que constituye la pro-secuencia es eliminado posteriormente a la secreción por la metaloproteasa BMP-1 (*bone morphogenetic protein-1*) (11). La función exacta del pro-segmento no es clara, pero su presencia parece impedir la correcta maduración de las HDL (12). En intestino, apoAI es secretada formando parte de quilomicrones. En hígado, donde se genera la mayor parte de la apoAI circulante, es secretada en su mayor parte como apoAI libre o pobre en lípidos, y en menor proporción (20%) en forma de complejos dHDL ensamblados en retículo endoplásmico y Golgi (13) (14).

## IV. Mecanismos moleculares del transporte reverso del colesterol

La Figura 1 resume los principales eventos del RCT. ApoAI está involucrada en todas las etapas y al menos

Tabla I. Heterogeneidad y métodos de fraccionamiento de las partículas HDL

Propiedad	Método de fraccionamiento	Principales tipos de partículas
Densidad	Ultracentrifugación	HDL <sub>2</sub> (1,063-1,125 g/mL); HDL <sub>3</sub> (1,125-1,210 mg/mL)
Tamaño	Electroforesis sobre geles de poliacrilamida en gradiente (GGE)	HDL <sub>2b</sub> (10,6 nm); HDL <sub>2a</sub> (9,2 nm); HDL <sub>3a</sub> (8,4 nm); HDL <sub>3b</sub> (8,0 nm); HDL <sub>3c</sub> (7,6 nm)
Carga superficial	Electroforesis sobre geles de agarosa	$\alpha$ -HDL; pre- $\alpha$ HDL; pre- $\beta$ HDL <sup>(1)</sup> ; $\gamma$ -HDL <sup>(2)</sup>
Composición apolipoproteica	Inmunoafinidad	Lp-AI <sup>(3)</sup> ; LpAI+AII <sup>(3)</sup> ; Lp-E <sup>(2)</sup>

(1) Alrededor del 5% de la apoAI sérica migra como pre- $\beta$ . Por electroforesis bidimensional, las pre- $\beta$  HDL son subfraccionadas en pre- $\beta$ 1, pre- $\beta$ 2 y pre- $\beta$ 3 de acuerdo a su tamaño creciente. Pre- $\beta$ 1 y pre- $\beta$ 2 contienen sólo apoAI, y a su vez pueden ser subfraccionadas por tamaño en pre- $\beta$ 1a, pre- $\beta$ 1b, pre- $\beta$ 2a, pre- $\beta$ 2b y pre- $\beta$ 2c. Mientras que las pre- $\beta$ 1 son monoméricas y pobres en lípidos, las pre- $\beta$ 2 son dimericas y de morfología discoidal.

(2) Las  $\gamma$ -HDL contienen apoE como principal apolipoproteína

(3) LpAI contienen exclusivamente apoAI mientras que LpAI+AII contienen apoAI y apoAII en relación molar 2/1. Alrededor del 65% de la apoAI plasmática se encuentra en la población LpAI+AII, mientras que el 25% se encuentra en LpAI. La mayoría de las partículas LpAI tienen la densidad y tamaño de las HDL<sub>2</sub>, mientras que la mayoría de las LPAI+AII flotan con las HDL<sub>3</sub>.



en HDL, lo que determina un gradiente que favorece la captación de más FC celular. Otras proteínas séricas importantes en la remodelación de las HDL son las proteínas transferidora de PL (PLTP) y de CE (CETP) que catalizan la transferencia de PL, CE y TG entre HDL y LDL o VLDL.

En el hígado, el SR-BI une a las HDL y media la captación selectiva de CE y FC. La unión depende de la conformación de apoAI y es más eficiente para las HDL de mayor tamaño, y menos eficiente cuando las HDL contienen apoAII (27). Este proceso, así como la hidrólisis de los TG y PL de las HDL por las lipasas endotelial (EL) y hepática (EH) resultan en una disminución del contenido de lípidos de las HDL, lo que resulta en la liberación de apoAI al medio que reinicia el ciclo. El SR-BI también funciona como un receptor transductor de señales con importantes funciones antiaterogénicas en el endotelio (28) (29). A través de SR-BI, las HDL activan a la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) mejorando así el tono vascular; y promueven la migración celular en la neovascularización activando la vía PI3K/Akt/MAPK. Otros efectos arterioprotectores del SR-BI son mediados por su rol de transportador de lípidos bioactivos (29).

## V. Propiedades estructurales de apoAI

### A) ESTRUCTURA PRIMARIA Y SECUNDARIA

La apoAI humana madura es un polipéptido de 243 aminoácidos (28.1 kDa) codificado por un gen localizado en el cromosoma 11 que contiene 4 exones y 3

intrones. El primer exón es una secuencia no traducida, mientras que el segundo exón y el comienzo del tercero codifican a las pre- y pro-secuencias. El resto del exón 3 codifica la secuencia de los primeros 43 residuos de la proteína madura en los que se predice una  $\alpha$ -hélice anfipática similar a las presentes en proteínas globulares (clase G\*), con una disposición radial aleatoria de los residuos cargados en la cara polar de la hélice (30). El exón 4 codifica la secuencia que abarca los residuos 44-243, la que contiene 10 repeticiones en *tándem* con la periodicidad de una  $\alpha$ -hélice anfipática separadas casi siempre por prolina (Figura 2). Seis de estas repeticiones tienen una longitud de 22 aminoácidos y una distribución de los residuos cargados en la cara polar que es típica en todas las apolipoproteínas intercambiables ( $\alpha$ -hélices clase A). Estas se caracterizan por la localización de los residuos básicos cerca de la interfaz hidrofílica/hidrofóbica y de los residuos ácidos en el centro de la cara polar, y constituyen el motivo de unión a lípido mayoritario en todas las apolipoproteínas intercambiables. También se hallan presentes en apoAI dos pares de repeticiones (3-4 y 9-10), cada una formada por un segmento de 11 aminoácidos separado por una prolina de un segmento de 22 residuos. En éstas, la distribución de cargas positivas se asemeja a la letra "Y", con dos residuos positivos en la interfaz hidrofílica/hidrofóbica y un tercero en el centro de la cara polar de la hélice, mientras que los residuos negativos se agrupan entre los brazos y la base de la "Y". Como se discute debajo, la distribución de cargas en la cara polar es de importancia para las interacciones inter-hélices o hélice-lípido.

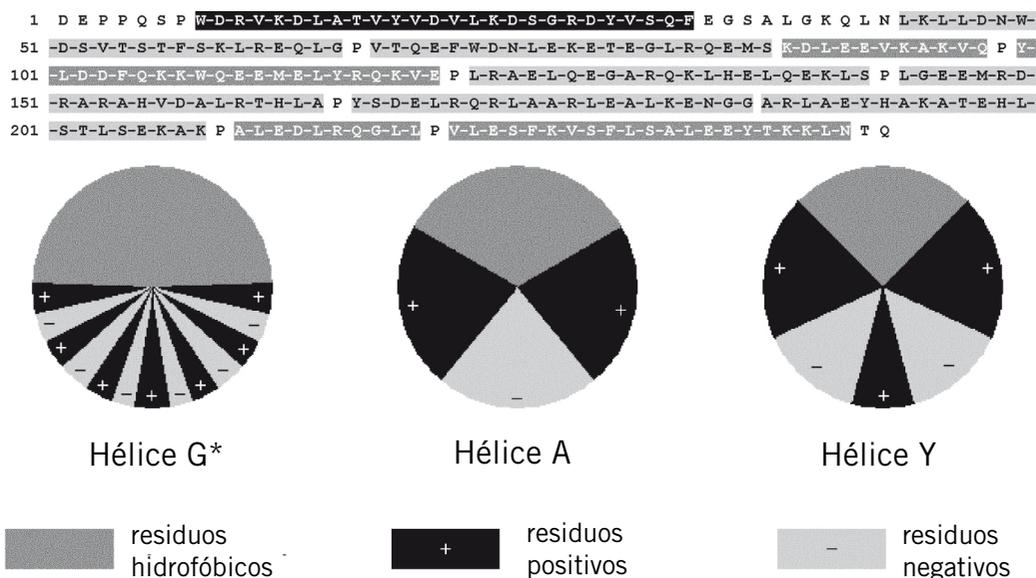


Figura 2. Las  $\alpha$ -hélices anfipáticas de apolipoproteína A-I. Arriba: Secuencia de apoAI humana indicando las regiones  $\alpha$ -helicoidales. La hélice G\* se indica en negro, las hélices A en gris claro con letras negras y las hélices Y en gris oscuro con letras blancas. Debajo: Diagramas indicando la distribución de residuos cargados en las  $\alpha$ -hélices anfipáticas tipo G\*, tipo A y tipo Y.

Las hélices predichas incluyen aproximadamente al 80% de los aminoácidos, lo que representaría el máximo contenido de hélice. Por comparación, la proteína libre de lípidos tiene un contenido de hélices de 46% que se incrementa al 69% y 78% en los estados unidos a vesículas lipídicas unilamelares pequeñas (SUV) y en dHDL, respectivamente (31).

#### B) ESTRUCTURA TERCIARIA

Varios estudios (32-34) han sugerido que la molécula de apoAI en su estado libre presenta 2 dominios estructurales; la parte central y del extremo N (residuos 1-189) forman un ramillete de hélices, mientras que las hélices del extremo C (residuos 193-243) forman una estructura separada y menos organizada. Aunque plegados en forma independiente, los dominios N y C de apoAI interactúan entre sí para mantener la estructura total de la proteína (35)(36). Estudios de desnaturalización térmica mostraron que apoAI exhibe una estructura débilmente plegada o de "glóbulo fundido", en la que las hélices no ocupan posiciones fijas respecto de las otras y no están organizadas en una única estructura terciaria (37).

Debido a estas características, compartida en mayor o menor medida por todas las apolipoproteínas intercambiables, es extremadamente dificultosa su cristalización para la resolución de su estructura por difracción de rayos X. La primera y única apolipoproteína intercambiable que fue cristalizada en su forma completa es la apolipoproteína III de *locusta migratoria* (38). Esta muestra un ramillete de 5  $\alpha$ -hélices conectadas por vueltas cortas. En el caso de apoAI, se logró la cristalización y resolución de la estructura de dos fragmentos: apoAI 44-243 (39) y recientemente apoAI 1-184 (40). Ambas estructuras son altamente helicoidales y de forma circular, lo que no concuerda con los datos obtenidos por otras metodologías para apoAI libre. Estas estructuras, sin embargo, se suponen mucho más representativas del estado unido a lípidos y han significado un importante avance para la comprensión de la estructura adoptada por apoAI en las HDL.

#### C) ESTRUCTURA CUATERNARIA

Es bien conocido que apoAI libre de lípidos se autoasocia reversiblemente en solución acuosa en función de la concentración y forma oligómeros a concentraciones mayores de 0,1 mg/mL, habiéndose propuesto un modelo que involucra un equilibrio entre monómeros-dímeros-tetrámeros-octámeros (41). Estudios con una mutante truncada en el extremo C indicaron que la oligomerización es menos pronunciada (42), lo que sugirió la participación de las hélices del extremo C en la autoasociación. Datos de este laboratorio con mutantes con un único residuo de triptófano en la hélice 4 mostraron que la oligomerización resulta en eficiente transferencia de energía y en la autoextinción de la fluorescencia, lo

que indica la participación de interacciones intermoleculares entre las hélices 4 en los oligómeros (43).

## VI. Interacción de apoAI con lípidos

La interacción de apoAI y otras apolipoproteínas intercambiables con vesículas fosfolipídicas puede tener dos consecuencias totalmente diferentes dependiendo de las condiciones y en especial de las propiedades de la membrana lipídica: a) la apolipoproteína puede unirse reversiblemente a la membrana sin producir su disrupción, o b) la interacción puede resultar en la micelización o solubilización de la membrana generando complejos lipoproteicos discoidales.

#### a) Mecanismo de unión a superficies lipídicas. Rol del par de hélices Y centrales

El dominio del extremo C es crítico para la unión a lípidos (31)(32)(44). En 1998 se propuso un mecanismo secuencial en el que la unión inicial de la región del extremo C es seguida por un cambio conformacional de la región 1-43 que desenmascara un dominio de unión a lípidos latente en la región 44-65 (45). Usando una serie de mutantes de delección, se mostró que la unión de apoAI a lípidos es modulada por la reorganización del ramillete de hélices del dominio N (32). Experimentos con apoAI marcada con pireno indican que el ramillete de hélices se abre al interactuar con la superficie de una partícula lipídica (46). La similitud de apoAI y apoE en cuanto a su organización en dos dominios estructurales condujo a la postulación de un mecanismo común de dos etapas para su unión a partículas lipídicas esféricas (32)(44). En este modelo, la apolipoproteína se une inicialmente a la superficie lipídica a través de las hélices anfipáticas del dominio del extremo C, proceso que es acompañado por un aumento en contenido de  $\alpha$ -hélice de este dominio (31)(32)(47). A continuación, el ramillete de hélices del dominio del extremo N se abre y las interacciones inter-hélices son reemplazadas por interacciones hélice-lípido.

Aunque con diferente afinidad, todas las hélices de apoAI tienen la capacidad de interactuar con superficies lipídicas. Se ha propuesto que las hélices clase A interactúan de acuerdo al modelo del "esnórquel" (48)(49), con su eje mayor paralelo a la superficie lipídica incrustando la cara hidrofóbica entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. La distribución de cargas en esta clase de hélices presentes en todas las apolipoproteínas intercambiables permite la estabilización de este modo de interacción a través de la formación de puentes salinos entre los residuos positivos de la interfaz hidrofílica/hidrofóbica con los grupos fosfato de los fosfolípidos (49).

Se conoce mucho menos sobre el modo de interacción con lípidos de las hélices clase "Y", y sobre el rol que juega esta particular distribución de cargas en la cara

polar así como la organización en pares de una hélice corta (11 residuos) seguida de una hélice larga (22 residuos). Uno de estos pares de hélices Y se localiza en el dominio del extremo C (hélices 9-10) que como se mencionó tiene alta afinidad por lípidos y es crítico para iniciar la unión de apoAI a superficies lipídicas. Por otro lado, varios estudios de este grupo se han centrado en la región central de apoAI donde se localiza el otro par de hélices Y (hélices 3-4) y se han obtenido evidencias de que su modo de interacción con membranas es diferente al del resto de las hélices de apoAI. La utilización de un análogo fosfolipídico fotoactivable (<sup>125</sup>I-TID-PC) que localiza su grupo reactivo cerca del centro de la bicapa lipídica permitió detectar que sólo esta región de apoAI se inserta profundamente en la membrana de manera de ser marcada por el reactivo (50). Más recientemente (43), se ha determinado la topología de inserción de este par de hélices en la membrana mediante el uso de una serie de mutantes de triptófano único (W@97, W@104 y W@108) y la accesibilidad a extinguidores paramagnéticos localizados en diferentes profundidades de la membrana. Estos datos, junto al hecho de que apoAI adquiere una estructura dimérica en el estado unido a membrana (51), permitieron postular un modelo de inserción en

el que un ramillete intermolecular formado por los dos pares de hélices 3-4 de un dímero de apoAI penetra en una de las monocapas de la membrana con el eje largo de las hélices paralelo a las cadenas hidrocarbonadas de los PL. Este modelo también atribuye un rol a la particular distribución de cargas (tipo Y) en las caras polares de las hélices, ya que la misma permite la formación de 8 puentes salinos que estabilizarían el ramillete de hélices (Figura 3).

b) Solubilización de membranas. Similitud entre la reacción con vesículas de PL en la transición de fase y la lipidación de apoAI mediada por ABCA1 en células.

El hecho de que apoAI pueda estabilizar a partículas de lípidos del rango de 10 nm indica que tiene propiedades detergentes y que puede solubilizar o microemulsionar lípidos. Ya en 1977 se demostró que apoAI reacciona espontáneamente con vesículas de dimiristoil-PC (DMPC) generando dHDL (52). El tamaño de los discos formados aumenta al incrementar la relación DMPC/apoAI (53), lo que es consistente con la localización de la proteína en el borde de los discos. Los primeros estudios cinéticos (54) mostraron que la conversión de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC en dHDL es

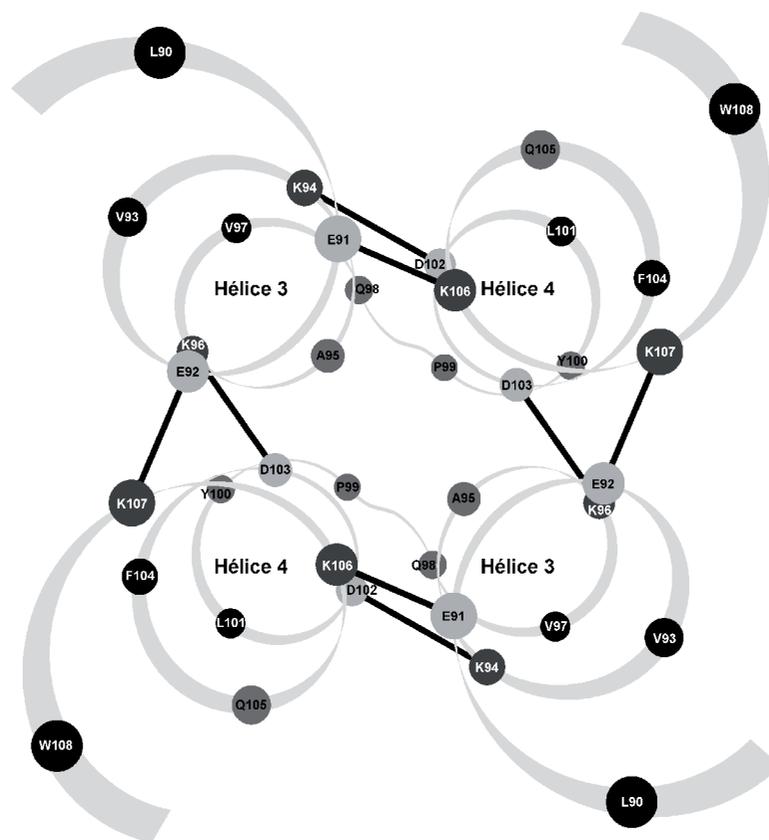


Figura 3. Modelo del ramillete intermolecular de las hélices 3-4 insertado en una membrana fosfolipídica. El ramillete es visto de arriba desde la superficie de la bicapa lipídica. Las barras negras indican los puentes salinos enlazando a los residuos positivos (en gris oscuro) con los residuos negativos (en gris claro). Los residuos restantes son hidrofóbicos (en negro) o polares sin carga (en gris).

muy rápida en la temperatura de transición ( $T_t$ ) de fase gel a líquido-cristalina ( $T_t$ ) de la DMPC (24 °C), pero muy lenta fuera de este rango de temperatura. En la  $T_t$ , la bicapa lipídica presenta coexistencia de dominios lipídicos en diferentes estados (gel o líquido-cristalino) separados lateralmente. En la interfase entre los dominios se producen defectos de empaquetamiento de los lípidos en la bicapa. La efectividad de la reacción en la  $T_t$  es atribuida a la presencia de estos defectos que crean sitios a los cuales se unen las moléculas de apoAI insertando sus  $\alpha$ -hélices y produciendo la desestabilización de la vesícula y su re-arreglo en partículas dHDL (55)(56). Todas las apolipoproteínas intercambiables son activas en este proceso, aunque su eficiencia depende del peso molecular, hidrofobicidad y estado de autoasociación (57).

Como la reacción es de segundo orden y consiste de dos fases simultáneas (58), se propusieron dos tipos diferentes de sitios de unión (con o sin defectos de empaquetamiento) 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. La unión a la superficie de la bicapa es un proceso reversible, pero la conversión en dHDL es irreversible. El grado de curvatura de la bicapa también es importante. En la reacción con vesículas unilamelares pequeñas (SUV) no se detectaron complejos intermediarios (59), pero con vesículas unilamelares grandes (LUV), la formación de pequeñas dHDL procede a través de la formación de intermediarios más grandes (60).

Así, la reacción de solubilización de vesículas lipídicas no ocurre en ausencia de defectos de empaquetamiento y explica la baja eficiencia del proceso a temperaturas lejanas a  $T_t$ , donde ocurre la unión de apoAI a las vesículas pero sin que se produzca su disrupción. Esto ocurre por ejemplo con vesículas de palmitoil-oleil PC (POPC) que tienen una  $T_t$  de -5 °C, las que son muy eficientes para unir apoAI pero al mismo tiempo muy estables a la micelización. Sólo a temperaturas cercanas al punto de congelamiento del agua se pudo detectar una lenta disminución de la turbidez por el agregado de apoAI, con un tiempo de vida media de 1-2 días comparado con el de menos de 1 hora para DMPC. El análisis de los productos formados indicó la presencia de complejos de menor tamaño que los formados con DMPC a 24 °C (70 *vs.* 140 kDa). La presencia de colesterol en vesículas de PC afecta diferentemente a ambos procesos (unión y solubilización). La unión es favorecida por la presencia de colesterol en vesículas de PC insaturadas (61). El proceso de solubilización de vesículas de DMPC, en cambio, es favorecido a bajas concentraciones de colesterol debido a la mayor unión, pero es inhibido a concentraciones de colesterol superiores al 15-20% lo que probablemente sea debido a que la transición de fase es atenuada (55).

Usando mezclas de fosfolípidos se ha determinado que la reacción sólo es efectiva en sistemas con heterogeneidad gel/líquido-cristalino, siendo inefectiva en sistemas con heterogeneidad sólido/sólido, fluido/fluido o líquido-cristalino/líquido-ordenado (62). Con una mezcla equimolar de DMPC y diestearoil-PC (DSPC) que presenta heterogeneidad gel/líquido-cristalino en un amplio rango de temperatura (entre 28 y 60 °C), la reacción ocurre sólo cerca de 28 °C. Por microscopía de fluorescencia de dos fotones en vesículas unilamelares gigantes (GUV) se detectó la coexistencia de grandes dominios lipídicos entre 50 y ~30 °C, los que al bajar la temperatura cerca de 28 °C disminuyen progresivamente de tamaño hasta su desaparición. Esto sugiere que la reacción requeriría de pequeños dominios fluidos en un continuo de fase gel. Se determinó, además, que la remoción de lípidos ocurre preferencialmente desde los dominios fluidos enriquecidos en DMPC (62).

Otros factores además de la  $T_t$ , pueden facilitar el proceso. Por ejemplo, la reacción con vesículas de PC insaturadas como PC de huevo no ocurre a pH neutro, pero es facilitada a pH<5 (63). Esto fue atribuido a un cambio conformacional en apoAI que la hace más efectiva en la reacción. En este grupo se ha observado recientemente que esto también ocurre con vesículas de POPC generándose dHDL de unos 140 kDa. También es conocido que con PL cargados negativamente como dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG), la reacción ocurre aún a temperaturas bien encima de la  $T_t$  (64). En este laboratorio se ha observado que la microsolvubilización ocurre con vesículas de fosfatidilserina (PS) o mezclas de PS y POPC, pero los productos formados son de tamaño bastante menor que los formados con DMPC (70-80 kDa).

Es claro que si apoAI fuera eficiente para solubilizar membranas con cualquier tipo de lípidos sería tóxica para las células. De allí la importancia de un mecanismo específico auxiliado por una proteína traslocadora de fosfolípidos como es ABCA1. Se ha propuesto que el mecanismo de formación de las dHDL nacientes mediado por ABCA1 ocurriría por un mecanismo básicamente similar al que ocurre con vesículas de DMPC (19)(65). ApoAI 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 PL desde la capa interna a la externa de la membrana esta última queda más poblada en PL, 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  $T_t$  de una vesícula de PL, a los que se une apoAI produciendo la microsolvubilización de la membrana y generación de las dHDL nacientes.

## VII. Conformación de apoAI en partículas HDL discoidales

Debido a la baja proporción en suero de dHDL y a su gran heterogeneidad, la mayoría del conocimiento sobre la estructura de estos complejos proviene de estudios con dHDL reconstituidas artificialmente. Uno de los métodos usados para la reconstitución es la mencionada microsolvubilización espontánea de vesículas de PL en la Tt. Este método tiene la desventaja de estar restringido sólo a algunos PL con Tt accesible y compatible con muestras biológicas. En la práctica, sólo ha sido utilizado con DMPC y dipalmitoil-PC (Tt = 41 °C). Otro método de reconstitución, que no presenta esta restricción y puede usarse con cualquier tipo de PL, incluidos aquellos fisiológicos que contienen ácidos grasos insaturados como POPC, es hacer complejos micelares de PL, apoAI y un detergente dializable como colato. Luego de eliminar el colato por diálisis, POPC y apoAI se auto-ensamblan en complejos HDL discoidales (66). Este es el método que más se ha utilizado en estudios estructurales y funcionales. Las partículas dHDL mejor caracterizadas son aquellas que contienen 2 moléculas de apoAI y unas 100 moléculas de palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC). Aunque varios modelos han sido propuestos, el de mayor sustento experimental es el denominado del “doble cinturón” (67), basado en gran parte en la estructura cristalina de apoAI( $\Delta$ 1-43) (39). 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 maneras antiparalelas y extendidas. El detalle de la organización de las hélices ha sido explorado por el uso de agentes entrecruzantes de lisinas, seguida de clivaje proteolítico y análisis de los péptidos resultantes por espectrometría de masa (68-70). 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 detec-

taron 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 (Figura 4). La coexistencia de arreglos alternativos en dHDL preparados por diálisis de complejos micelares con colato fue también detectada por transferencia de energía de resonancia (FRET) en dHDL preparadas con mutantes marcadas con grupos fluorescentes tanto en el caso de apoAI (71)(72) como con apoLpIII de insectos (73).

Sin embargo, en este laboratorio se han obtenido evidencias de que cuando las de dHDL son preparadas por la reacción de microsolvubilización directa de vesículas de DMPC a 24 °C, el arreglo o configuración de las moléculas de apoAI es diferente al que resulta de la reconstitución usando diálisis de 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 (74). Además, usando mutantes de único residuo triptófano en la hélice 4 (W@104 y W@108), se encontró una mayor eficiencia de homotransferencia de energía Trp-Trp y de auto-extinción de la fluorescencia en aquellas dHDL preparadas por la reacción directa (74), lo que indicó una menor distancia promedio entre las hélices 4 de cada molécula de apoAI en estas dHDL, y sugiere que en este caso podría existir casi exclusivamente la configuración LL5/2. Esto indujo a construir un juego de mutantes de cisteína (K107C, K133C y K226C) que permitan la marcación específica con grupos fluorescentes y a través de la estimación de distancias intermoleculares por FRET poder distinguir entre las configuraciones LL5/5 y LL5/2. Los datos de mediciones de homo- y hetero-FRET en dHDL reconstituidas con estas mutantes marcadas con diferentes grupos fluorescentes son consistentes con una configuración mayoritaria LL5/5 en las dHDL reconstituidas con colato, pero indican que la configuración mayoritaria en dHDL reconstituidas por la reacción de microsolvubilización directa es la LL5/2. Como



Figura 4. Diagrama de las configuraciones LL5/5 y LL5/2 para el doble cinturón de apoAI en dHDL. Sólo el arreglo configuracional LL5/2 permitiría la formación del ramillete intermolecular del par central de hélices Y.

se mencionó, el mecanismo de generación de dHDL nacientes por células mediado por ABCA1 sería similar al que ocurre con vesículas de DMPC a 24 °C, por lo que es probable que el arreglo adoptado por apoAI en las dHDL nacientes generadas por la acción de ABCA1 sea también mayoritariamente LL5/2. Como se verá, el arreglo configuracional o registro de las hélices en el doble cinturón de las dHDL puede ser muy importante para sus propiedades funcionales.

El tamaño y contenido lipídico de las dHDL naturales o reconstituidas depende primariamente del número de moléculas de apoAI que conforman el disco, ya que pueden encontrarse discos de 2, 3, o más moléculas de apoAI. Sin embargo, también pueden formarse discos con el mismo número de moléculas de apoAI, pero con diferente tamaño y contenido lipídico. La circunferencia de éstos últimos varía de manera discreta, lo que sugirió la existencia de dominios de alta flexibilidad, denominados “bisagras” (75), que al estar en conformaciones alternativas (“abierta” o despegada de los lípidos y “cerrada” o en contacto con los lípidos) permitiría que diferente número de hélices queden en contacto con el borde del disco. Uno de estos dominios podría estar constituido por el par de hélices Y central 3-4, ya que se observó que se marca con menor eficiencia que el resto de la molécula de apoAI con un reactivo fotoactivable hidrofóbico agregado a las dHDL (50), aunque otros autores propusieron que las hélices 5, 6 y 7 también podrían comportarse como “bisagras” (75-77). Por la inmunorreactividad con anticuerpos monoclonales, se detectó que la conformación de apoAI en las dHDL es afectada no sólo por el tamaño de los discos sino también por su contenido de colesterol (77) (78). Mientras que epítopes del extremo N se hacen más inmunorreactivos al aumentar el tamaño y contenido de colesterol de las dHDL, lo contrario sucede para epítopes de la región del centro de la molécula de apoAI. Así, tanto el aumento de tamaño como el contenido de colesterol disminuyen el grado de exposición de las hélices centrales.

## VIII. Interacción de dHDL con membranas. Rol de par de hélices Y central

Las dHDL, en especial aquellas de menor tamaño y libres de colesterol, conservan la capacidad de unirse a membranas fosfolipídicas (78) (79). Ya en 1992, Rothblat postuló que en las dHDL, un segmento de apoAI (posiblemente un dominio “bisagra”) quedaría disponible para interactuar con membranas y favorecer el intercambio de colesterol (80). En las HDL esféricas en cambio, este dominio de apoAI estaría en estrecho contacto con los lípidos de la partícula lipoproteica

y por lo tanto no disponible para la interacción con membranas. En 1998 se demostró que no sólo apoAI sino también 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 (78). Posteriormente, se identificó a esta región como la correspondiente al par de hélices Y central, ya que es exclusivamente marcada cuando apoAI libre o dHDL son incubadas con vesículas que contienen un análogo fosfolipídico fotoactivable (50). Así, es muy probable que el ramillete intermolecular del par de hélices Y centrales 3-4, que se propusieron para la interacción de apoAI libre con membranas, 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 (78) (79), y estos factores modifican la conformación de la región central disminuyendo su grado de exposición, se ha propuesto que la formación del dominio de inserción activo podría ser dificultada en dHDL grandes y ricas en colesterol (81). 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.

Con un péptido sintético que abarca la secuencia del par de hélices Y central (AI 77-120), se obtuvo evidencia 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 (51). 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 tetamérico 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.

## IX. Importancia funcional del par central de hélices Y. Respuestas celulares alteradas a la mutante $\Delta$ K107

La velocidad de intercambio de colesterol entre dHDL y vesículas lipídicas se correlaciona con la capacidad de interacción (82), 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 radiomarcado (51). 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.

La hipótesis original de Rothblat (80) atribuye la disminución de afinidad de dHDL por la membrana a su conversión de disco a esfera mediada por LCAT. Sin embargo, como la actividad de LCAT es muy baja en linfa y líquido intersticial (83), la conversión de disco a esfera debería ocurrir en plasma. Los resultados de este trabajo indican que el aumento de tamaño de las dHDL (por la captación de fosfolípidos) y el enriquecimiento en colesterol serían los determinantes de la disminución de afinidad por la membrana que permitiría la liberación de grandes discos ricos en colesterol a la circulación donde serían un buen sustrato de LCAT.

Recientes mediciones de la capacidad de dHDL reconstituidas con DMPC para remover colesterol de cultivos de macrófagos murinos indicaron que las dHDL reconstituidas por la reacción de micelización directa son más activas que aquellas reconstituidas por diálisis con colato las que presentaron un muy bajo nivel de actividad. Esto podría ser explicado por la imposibilidad de que pueda formarse el ramillete intermolecular de los pares de hélices Y centrales en la configuración LL5/5 (mayoritaria en las dHDL reconstituidas con colato). Sin embargo, es bien conocido que dHDL reconstituidas por diálisis de colato con POPC son activas para remover colesterol de macrófagos (84) y células CHOK1 (85). Aunque futuros estudios son necesarios para aclarar esta aparente discrepancia, la misma podría ser atribuida en principio a las diferentes propiedades de DMPC y POPC. La mayor fluidez de las bicapas de POPC podrían permitir una más rápida reorganización de las dHDL o la liberación de apoAI libre o pobre en lípidos que pueda mediar la remoción de colesterol mediante la generación de nuevas dHDL nacientes por la acción de ABCA1.

Otras evidencias de la importancia funcional de esta región del centro de apoAI provienen de estudios con cultivos celulares y del uso de mutantes de apoAI. Por

un lado, se determinó que el péptido AI 77-120 es tan efectivo como apoAI para promover la salida de colesterol de células CHOK1 (51) (85) y para movilizar depósitos intracelulares de colesterol hacia la membrana plasmática como aquel disponible para ser esterificado por ACAT (86). Por otro lado, aunque la captación de colesterol de la membrana plasmática no está afectada, la capacidad de movilizar depósitos intracelulares de colesterol en células CHOK1 que presenta la apoAI tipo salvaje, prácticamente desaparece por la delección del residuo de lisina de posición 107 (ApoAI  $\Delta$ K107). Esta es una variante natural presente en el 0,1% de la población, cuyos portadores tienen un metabolismo alterado de las HDL e incrementado riesgo aterogénico (86). Se puede predecir que una delección puntual en una hélice anfipática modificará el registro o la orientación de las caras hidrofílica e hidrofóbica por unos 90-100° lo que puede alterar las propiedades de interacción con lípidos o con otras proteínas. Por otro lado, estas respuestas celulares no son alteradas cuando las dos hélices Y centrales (residuos 88-12) son reemplazadas por las dos hélices Y del extremo C (residuos 209-243) (85) indicando que no se requiere de una secuencia exacta mientras se mantenga la distribución de cargas tipo Y en la región central. Esta respuesta celular a apoAI es menos clara en el caso de macrófagos que pueden almacenar grandes cantidades de CE (84). Sin embargo, en ambos tipos de células, macrófagos y CHOK1, el tratamiento con  $\Delta$ K107 resulta en un dramático incremento (más de 10 veces) del nivel celular de la proteína ACAT en comparación con el tratamiento con apoAI salvaje. Ya que no se modifican los niveles de mRNA, esto podría deberse a una desregulación a nivel traduccional o de la degradación de ACAT. Como la activación de ACAT es un paso clave en la conversión de macrófagos en células espumosas, es posible que estas respuestas alteradas a  $\Delta$ K107 puedan estar relacionadas al incrementado riesgo aterogénico de los pacientes portadores de la mutación.

## X. Conclusiones generales

Resumiendo, los resultados permitieron postular que el par de hélices Y del centro de la molécula de apoAI (hélices 3-4) conformaría un dominio de inserción en membranas que funciona con relativa independencia del resto de la molécula de apoAI. Al interactuar con la región homóloga de otra molécula de apoAI en un dímero, formaría un ramillete intermolecular activo estabilizado por uniones salinas, que a diferencia del resto de las  $\alpha$ -hélices de apoAI se incrusta en la capa externa de la membrana perpendicularmente a la superficie. Además de ser funcional en el caso de la apoAI libre de lípidos, también podría serlo en las dHDL, donde la formación del ramillete intermolecular activo, y por

tanto la modulación de su actividad, puede depender de diferentes factores como: a) la configuración o registro de una molécula de apoAI respecto de la otra en el disco, siendo activo en la configuración LL5/2 e inactivo en la LL/5/5, y b) el tamaño y contenido de colesterol de las dHDL que dificultarían su formación.

Además de tener un rol en el anclaje de dHDL a membrana y facilitar el intercambio de colesterol, este dominio también podría funcionar como disparador de señales intracelulares que resultan en la modulación de ACAT y movilización de depósitos endógenos de colesterol. Aunque no parece requerir de una secuencia exacta mientras se mantenga la distribución de cargas tipo Y, se requiere de la correcta orientación de las  $\alpha$ -hélices anfipáticas que lo conforman, la que es afectada por una delección como en el caso de la mutante  $\Delta K107$ . Futuros estudios son necesarios para entender con mayor detalle tanto los cambios conformacionales involucrados en la formación del dominio activo como los mecanismos moleculares involucrados en las respuestas celulares alteradas a  $\Delta K107$

#### CORRESPONDENCIA

DR. HORACIO ALBERTO GARDA  
 Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata  
 Facultad de Ciencias Médicas  
 Calles 60 y 120  
 (1900) LA PLATA, Buenos Aires, Argentina.  
 Teléfono: (0221)482-4894 Fax: (0221) 425-8988  
 E-mail: hgarda@med.unlp.edu.ar

#### Referencias bibliográficas

1. Vergeer M, 1 Adriaan G, Holleboom AG, Kastelein JJP, Kuivenhoven JA. The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *J Lipid Res* 2010; 51: 2058-73.
2. Smith JD. Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11: 989-96.
3. Garelnabi M. Emerging evidences from the contribution of the traditional and new risk factors to the atherosclerosis pathogenesis. *J Med Sci* 2010; 10: 153-61.
4. Kathiresan S, Rader DJ. Lipoprotein disorders. En: Ginsburg GS, Willard HF, editors. *Essentials of genomic and personalized medicine*. San Diego, USA: Academic Press, Elsevier Inc; 2010. p. 269-88.
5. Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* 2012; 4: 251-68.
6. Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, *et al.* Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* 2012; 125: 1905-19.
7. McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 331-47.
8. Saito H, Lund-Katz S, Phillips MC. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 350-80.
9. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21: 229-38.
10. Krimbou L, Marcil M, Genest J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 258-67.
11. Chau P, Fielding PE, Fielding CJ. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) cleaves human proapolipoprotein A1 and regulates its activation for lipid binding. *Biochemistry* 2007; 46: 8445-50.
12. Francone OL, Ishida BY, de la Llera-Moya M, Royer L, Happe C, Zhu J, *et al.* Disruption of the murine procollagen C-proteinase enhancer 2 gene causes accumulation of pro-apoA-I and increased HDL levels. *J Lipid Res* 2011; 52: 1974-83.
13. Chisholm JW, Bureson ER, Shelness GS, Parks JS. ApoA-I secretion from HepG2 cells: evidence for the secretion of both lipid-poor apoA-I and intracellularly assembled nascent HDL. *J Lipid Res* 2002; 43: 36-44.
14. Maric J, Kiss RS, Franklin V, Marcel YL. Intracellular lipidation of newly synthesized apolipoprotein A-I in primary murine hepatocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 39942-9.
15. Voloshyna I, Reiss AB. The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 213-24.
16. Ashraf MZ, Gupta N. Scavenger receptors: Implications in atherothrombotic disorders. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 697-700.
17. Kang MH, Singaraja R, Hayden MR. Adenosine-triphosphate-binding cassette transporter-1 trafficking and function. *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20: 41-9.
18. Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2150-60.
19. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhana-sekaran P, Saito H, *et al.* 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.
20. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1735: 1-19.
21. Wang N, Tall AR. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1178-84.
22. Yokoyama S. Assembly of high-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 20-7.

23. Zhao GJ, Yin K, Fu YC, Tang CK. The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol Med* 2012; 18: 149-58.
24. Yamauchi Y, Chang CC, Hayashi M, Abe-Dohmae S, Reid PC, Chang TY, *et al.* Intracellular cholesterol mobilization involved in the ABCA1/apolipoprotein-mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts. *J Lipid Res* 2004; 45: 1943-51.
25. Sviridov D, Fidge N, Beaumier-Gallon G, Fielding C. Apolipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae). *Biochem J* 2001; 358: 79-86.
26. 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.
27. Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M. Scavenger receptor BI: A multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5916-24.
28. Saddar S, Mineo C, Shaul PW. Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 144-50.
29. Al-Jarallah A, Trigatti BL. A role for the scavenger receptor, class B type I in high density lipoprotein dependent activation of cellular signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 1239-48.
30. 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* 1992; 33: 141-66.
31. Saito H, Dhanasekaran P, Nguyen D, Deridder E, Holvoet P, Lund-Katz S, *et al.* Alpha-helix formation is required for high affinity binding of human apolipoprotein A-I to lipids. *J Biol Chem* 2004; 279: 20974-81.
32. Saito H, Dhanasekaran P, Nguyen D, Holvoet P, Lund-Katz S, Phillips MC. Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E: A general model. *J Biol Chem* 2003; 278: 23227-32.
33. Brouillette CG, Dong WJ, Yang ZW, Ray MJ, Protasevich II, Cheung HC, *et al.* Forster resonance energy transfer measurements are consistent with a helical bundle model for lipid-free apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 2005; 44: 16413-25.
34. Silva RAG, Hilliard GM, Fang J, Macha S, Davidson WS. A three-dimensional molecular model of lipid-free apolipoprotein A-I determined by cross-linking/mass spectrometry and sequence tracking. *Biochemistry* 2005; 44: 2759-69.
35. Fang Y, Gursky O, Atkinson D. Structural studies of N- and C-terminally truncated human apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 2003; 42: 6881-90.
36. Tricerri MA, Behling Agree AK, Sanchez SA, Jonas A. Characterization of apolipoprotein A-I structure using a cysteine-specific fluorescence probe. *Biochemistry* 2000; 39: 14682-91.
37. Gursky O, Atkinson D. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-I: implications for a lipid-free molten globular state. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2991-5.
38. Breiter DR, Kanost MR, Benning MM, Wesenberg G, Law JH, Wells MA, Rayment I, Holden HM. Molecular structure of an apolipoprotein determined at 2.5-Å resolution. *Biochemistry* 1991; 30: 603-8.
39. 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 USA* 1997; 94: 12291-6.
40. Mei X, Atkinson D. Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization. *J Biol Chem* 2011; 286: 38570-82.
41. Vitello LB, Scanu AM. Studies on human serum high density lipoproteins. Self-association of apolipoprotein A-I in aqueous solutions. *J Biol Chem* 1976; 251: 1131-6.
42. Davidson WS, Hazlett T, Mantulin WM, Jonas A. The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13605-10.
43. Prieto ED, Garda HA. Membrane insertion topology of the central apolipoprotein A-I region. Fluorescence studies using single tryptophan mutants. *Biochemistry* 2011; 50: 466-79.
44. Saito H, Lund-Katz S, Phillips MC. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 350-80.
45. Rogers DP, Roberts L, Lebowitz J, Datta G, Anantharamaiah GM, Engler JA, Brouillette CG. The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: Effects of amino-terminal deletions. *Biochemistry* 1998; 37: 11714-25.
46. Kono M, Okumura Y, Tanaka M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Lund-Katz S, Phillips MC, Saito H. Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I bound to spherical lipid particles. *Biochemistry* 2008; 47: 11340-7.
47. 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* 2003; 10: 455-60.
48. Anantharamaiah GM, Brouillette CG, Engler JA, De Loof H, Venkatachalapathi YV, Boogaerts J, Segrest JP. Role of amphipathic helices in HDL structure/function. *Adv Exp Med Biol* 1991; 285: 131-40.
49. Mishra VK, Palgunachari MN, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Interactions of synthetic peptide analogs of the class A amphipathic helix with lipids. Evidence for the snorkel hypothesis. *J Biol Chem* 1994; 269: 7185-91.
50. 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.

51. 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* 2004; 428: 188-97.
52. Jonas A, Krajnovich DJ, Patterson BW. Physical properties of isolated complexes of human and bovine A-I apolipoproteins with L-alpha-dimyristoyl phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 1977; 252: 2200-5.
53. Tall AR, Small DM, Deckelbaum RJ, Shipley GG. Structure and thermodynamic properties of high density lipoprotein recombinants. *J Biol Chem* 1977; 252: 4701-11.
54. Pownall HJ, Massey JB, Kusserow SK, Gotto AM. Kinetics of lipid-protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high density lipoproteins with phosphatidylcholine. *Biochemistry* 1978; 17: 1183-8.
55. Pownall HJ, Massey JB, Kusserow SK, Gotto AM Jr. Kinetics of lipid-protein interactions: Effect of cholesterol on the association of human plasma high-density apolipoprotein A-I with L-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 1979; 18: 574-9.
56. Pownall H, Pao Q, Hickson D, Sparrow JT, Kusserow SK, Massey JB. Kinetics and mechanism of association of human plasma apolipoproteins with dimyristoylphosphatidylcholine: Effect of protein structure and lipid clusters on reaction rates. *Biochemistry* 1981; 20: 6630-5.
57. Jonas A. Lipid-binding properties of apolipoproteins. En: Rosseneu M, editor. *Structure and function of apolipoproteins*. Boca Raton: CRC Press; 1992. p. 217-50.
58. Segall ML, Dhanasekaran P, Baldwin F, Anantharamaiah GM, Weisgraber K, Phillips MC, *et al.* Influence of apoE domain structure and polymorphism on the kinetics of phospholipid vesicle solubilization. *J Lipid Res* 2002; 43: 1688-700.
59. Jonas A, Drengler SM, Patterson BW. Two types of complexes formed by the interaction of apolipoprotein A-I with vesicles of L-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem* 1980; 255: 2183-9.
60. Zhu K, Brubaker G, Smith JD. Large disk intermediate precedes formation of apolipoprotein A-I-dimyristoylphosphatidylcholine small disks. *Biochemistry* 2007; 46: 6299-307.
61. Yokoyama S, Fukushima D, Kupferberg JP, Kézdy FJ, Kaiser ET. The mechanism of activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I and an amphiphilic peptide. *J Biol Chem* 1980; 255: 7333-9.
62. Tricerri MA, Toledo JD, Sánchez SA, Hazlett TL, Gratton E, Jonas A, *et al.* Visualization and analysis of apolipoprotein A-I interaction with binary phospholipid bilayers. *J Lipid Res* 2005; 46: 669-78.
63. Fukuda M, Nakano M, Miyazaki M, Tanaka M, Saito H, Kobayashi S, *et al.* Conformational change of apolipoprotein A-I and HDL formation from model membranes under intracellular acidic conditions. *J Lipid Res* 2008; 49: 2419-26.
64. 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* 1986; 261: 16191-7.
65. Lund-Katz S, Phillips MC. High Density Lipoprotein Structure-Function and Role in Reverse Cholesterol Transport. *Subcell Biochem* 2010; 51: 183-227.
66. Jonas A, Kézdy KE, Wald JH. Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. *J Biol Chem* 1989; 264: 4818-24.
67. Segrest JP, Jones MK, Klon AE, Sheldahl CJ, Hellinger M, De Loof H, *et al.* A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999; 274: 31755-8.
68. Davidson WS, Silva RAG. Apolipoprotein structural organization in high density lipoproteins: Belts, bundles, hinges and hairpins. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 295-300.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Garda HA, Arrese EL, Soulages JL. Structure of apolipoprotein A-I in discoidal lipoproteins. Interhelical distances in the lipid-bound state and conformational change upon binding to lipid. *J Biol Chem*; 277: 19773-82.
74. 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.
75. Maiorano JN, Jandacek RJ, Horace EM, Davidson WS. Identification and structural ramifications of a hinge domain in apolipoprotein A-I discoidal high-density lipoproteins of different size. *Biochemistry* 2004; 43: 11717-26.
76. Reschly EJ, Sorci-Thomas MG, Davidson WS, Meredith SC, Reardon CA, Getz GS. Apolipoprotein A-I alpha -helices 7 and 8 modulate high density lipoprotein subclass distribution. *J Biol Chem* 2002; 277: 9645-54.
77. Bergeron J, Frank PG, Scales D, Meng QH, Castro G, Marcel YL. Apolipoprotein A-I conformation in reconstituted discoidal lipoproteins varying in phospholipid and cholesterol content. *J Biol Chem* 1995; 270: 27429-38.
78. Tricerri A, Córscico 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* 1998; 1391: 67-78.

79. Tricerri MA, Sanchez SA, Arnulphi C, Durbin DM, Gratton E, Jonas A. Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles. *J Lipid Res* 2002; 43: 187-97.
80. Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, Phillips MC. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J Lipid Res* 1992; 33: 1091-7.
81. Garda HA. Structure-function relationships in human apolipoprotein A-I: Role of a central helix pair. *Future Lipidol* 2007; 2: 95-104.
82. Toledo JD, Tricerri MA, Córscico B, Garda HA. Cholesterol flux between lipid vesicles and apolipoprotein AI discs of variable size and composition. *Arch Biochem Biophys* 2000; 380: 63-70.
83. Dory L, Sloop CH, Boquet LM, Hamilton RL, Roheim PS. Lecithin:cholesterol acyltransferase-mediated modification of discoidal peripheral lymph high density lipoproteins: possible mechanism of formation of cholesterol-induced high density lipoproteins (HDLc) in cholesterol-fed dogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3489-93.
84. Toledo JD, Cabaleiro LV, Garda HA, Gonzalez MC. Effect of reconstituted discoidal high-density lipoproteins on lipid mobilization in RAW 264.7 and CHOK1 cells. *J Cell Biochem* 2012; 113: 1208-16.
85. Gonzalez MC, Toledo JD, Tricerri MA, Garda HA. The central type Y amphipathic alpha-helices of apolipoprotein AI are involved in the mobilization of intracellular cholesterol depots. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 34-41.
86. Tilly-Kiesi M, Zhang Q, Ehnholm S, Kahri J, Lahdenperä S, Ehnholm C, Taskinen MR. ApoA-I Helsinki (Lys107-->O) associated with reduced HDL cholesterol and LpA-I:A-II deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1294-306.

**Aceptado para su publicación el 4 de febrero de 2013**