



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Apolipoproteína A-I humana: Adaptabilidad conformacional e interacción con lípidos estudiada por espectroscopia de fluorescencia y métodos computacionales***

---

**Tesista: Lic. Wilson A. Tárraga**

**Director: Dr. Horacio A. Garda**

**Directora: Dra. Marina C. González**

**Codirector: Dr. Lisandro J. Falomir-Lockhart**

**Año: 2021**

Esta página se encuentra en blanco

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) "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Horacio A. Garda y la Dra. Marina C. González y la codirección del Dr. Lisandro J. Falomir-Lockhart.

Esta página se encuentra en blanco

## **Agradecimientos**

A mis directores, el Dr. Horacio A. Garda y la Dra. Marina C. González, quienes han confiado en mí para llevar a cabo esta Tesis Doctoral y me han acompañado en este proceso.

A mi codirector, el Dr. Lisandro J. Falomir-Lockhart quien me ha guiado en este trabajo.

De nuevo al Dr. Horacio A. Garda y al INIBIOLP por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de esta Tesis.

A las instituciones que hicieron posible el financiamiento de esta Tesis: CONICET, AGENCIA, la Universidad Nacional de La Plata y la Facultad de Ciencias Médicas.

A todos los integrantes del INIBIOLP.

A mi madre Inés, y a mi hermana Nadin, quienes han estado ahí desde siempre presentes.

Esta página se encuentra en blanco

## Publicaciones

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes trabajos:

W.A. Tárraga, H.A. Garda, L.J. Falomir-Lockhart, M.C. González, Dataset on pyrene-labelled apolipoprotein A-I, model development and fitting to monitor oligomeric species of its lipid-free form, Data Br. (2021) 106829. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.106829>.

W.A. Tárraga, L.J. Falomir-Lockhart, H.A. Garda, M.C. González, Analysis of pyrene-labelled apolipoprotein A-I oligomerization in solution: Spectra deconvolution and changes in P-value and excimer formation, Arch. Biochem. Biophys. 699 (2021) 108748. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108748>.

Esta página se encuentra en blanco



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Enfermedades cardiovasculares	3
1.2 Aterosclerosis	4
1.2.1 Causas que llevan al desarrollo de la aterosclerosis	7
1.3 Transporte reverso del colesterol	9
1.4 Proteína mayoritaria de las HDL: apolipoproteína A-I	13
1.4.1 ApoA-I monomérica	13
1.4.2 ApoA-I oligomérica	16
1.4.3 Unión de apoA-I a membranas lipídicas	20
1.4.4 ApoA-I en HDL discoidales	21
1.4.4.1 Estructura secundaria	21
1.4.4.2 Estructura terciaria	24
1.4.5 ApoA-I en HDL esféricas	30
1.5 Propiedades espectrales del pireno	31
1.5.1 P-value	33
1.5.2 Excímero de pireno	34
1.6 Objetivos	37
1.6.1 Objetivos generales	37
1.6.2 Objetivos específicos	37
<b>CAPÍTULO 2: RESULTADOS</b>	<b>39</b>
2.1 Construcción de variantes mutantes de apoA-I	41
2.1.1 Objetivos	41
2.1.2 Generación de variantes mutantes	42
2.1.3 Conclusión	44
2.2 Expresión, purificación y marcación de variantes mutantes de apoA-I	45
2.2.1 Objetivos	45
2.2.2 Obtención de cepas de expresión	45
2.2.3 Expresión y purificación	46
2.2.4 Marcación de proteínas	50
2.2.5 Conclusión	51
2.3 Controles estructurales de variantes mutantes de apoA-I	52

2.3.1	Objetivos	52
2.3.2	Estimación de la estabilidad de plegamiento <i>in silico</i> de apoA-I libre lípidos	52
2.3.3	Estabilidad protéica en solución	56
2.3.4	Estabilidad <i>in silico</i> de apoA-I unida a lípidos	59
2.3.5	Reconstitución de partículas de HDL por diálisis con colato	61
2.3.6	Reconstitución de partículas de HDL por microsolubilización directa	63
2.3.7	Conclusión	65
<b>2.4</b>	<b>Oligomerización de apoA-I estudiada con mutantes de cisteína marcadas con pireno</b>	<b>67</b>
2.4.1	Objetivos	67
2.4.2	Oligomerización estudiada con mutantes de cisteína de apoA-I	68
2.4.3	Conclusión	70
<b>2.5</b>	<b>Desarrollo de modelos matemáticos de oligomerización y análisis de mutantes de apoA-I marcadas con pireno</b>	<b>72</b>
2.5.1	Objetivos	72
2.5.2	Análisis con modelos de asociación de equilibrio único	72
2.5.3	Deconvolución de espectros de emisión de fluorescencia del pireno	75
2.5.4	Conclusión	79
<b>2.6</b>	<b>Análisis con modelos de asociación múltiple</b>	<b>81</b>
2.6.1	Objetivos	81
2.6.2	Modelos de asociación múltiple	82
2.6.3	Predicción de oligómeros por métodos computacionales	97
2.6.4	Conclusión	100
<b>2.7</b>	<b>Interacción con membranas biológicas</b>	<b>102</b>
2.7.1	Objetivos	102
2.7.2	Interacción con membrana SUV	103
2.7.3	Reconstitución de rHDL con mutantes de apoA-I marcadas con pireno	107
2.7.4	Reconstitución de dHDL en entornos celulares	112
2.7.5	Conclusión	115
<b>CAPÍTULO 3:</b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>117</b>
<b>CAPÍTULO 4:</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>129</b>
<b>4.1</b>	<b>Protocolos generales</b>	<b>131</b>
4.1.1	Obtención de células competentes	131
4.1.2	Transformación de bacterias competentes	132
4.1.3	Expresión y purificación de mutantes de cisteínas de apoA-I	132
4.1.4	Expresión y purificación de apoA-I WT	135
4.1.5	Marcación de proteínas	135
4.1.6	Cuantificación del grado de marcación	137
4.1.7	Ensayo de proteínas con ácido bicinonónico (BCA)	138
4.1.8	Sistema de gel desnaturizante (SDS-PAGE)	138
4.1.9	Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUV)	139
4.1.10	Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV)	139
4.1.11	Cuantificación de fósforo inorgánico	140
4.1.12	Tratamiento con células THP-1	141
<b>4.2</b>	<b>Protocolos experimentales</b>	<b>142</b>

4.2.1	Control de integridad estructural	142
4.2.1.1	Estimación del centro de masa	142
4.2.1.2	Desnaturalización con GdHCl	143
4.2.2	Reconstitución de rHDL conteniendo apoA-I	144
4.2.2.1	Reconstitución por diálisis con colato	144
4.2.2.2	Reconstitución por microsolubilización directa	145
4.2.3	Obtención de espectros de emisión de pireno	147
4.2.3.1	Corrección de espectros de pireno	148
4.2.3.2	Deconvolución de espectros	149
<b>4.3</b>	<b>Desarrollo de modelos matemáticos de asociación de apoA-I</b>	<b>152</b>
4.3.1	Equilibrio único para cambios en la relación E/M	152
4.3.2	Equilibrio único para cambios en P-value	155
4.3.3	Equilibrios múltiples para cambios en la relación E/M y P-value, modelo M1	157
4.3.4	Equilibrios múltiples para cambios en la relación E/M y P-value, modelos M2, M3 y M4	169
<b>4.4</b>	<b>Análisis de datos</b>	<b>172</b>
4.4.1	Análisis estadísticos	172
4.4.2	Criterios de selección de modelos	172
4.4.2.1	Criterios predictivos	173
4.4.2.2	Criterios basados en la información estadística	174
4.4.2.2.1	Criterio de información de Akaike (AIC)	175
4.4.2.2.2	Criterio de información de Akaike corregido (AICc)	176
4.4.2.2.3	Criterio de información Bayesiano (BIC)	176

---

**BIBLIOGRAFÍA** **179**

---

**ANEXO** **191**

Esta página se encuentra en blanco

## Abreviaturas

<b>ABCA1</b>	Transportador dependiente de ATP sub-familia A miembro 1
<b>ABCG1</b>	Transportador dependiente de ATP sub-familia G miembro 1
<b>AIC</b>	Criterio de información de <i>Akaike</i>
<b>ApoA-I</b>	Apolipoproteína A-I
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AUC</b>	Ultracentrifugación analítica
<b>BCA</b>	Ensayo de ácido bicinconínico
<b>BIC</b>	Criterio de información bayesiano
<b>BME</b>	$\beta$ -mercaptoetanol
<b>Br-cAMP</b>	Bromo adenosín monofosfato cíclico
<b>cAIC</b>	AIC corregido
<b>cDNA</b>	DNA codificante
<b>CE</b>	Éster de colesterol
<b>CETP</b>	Proteína transportadora de éster de colesterol
<b>CHD</b>	Enfermedad coronaria
<b>CM</b>	Centro de masa
<b>CVD</b>	Enfermedad cardiovascular
<b>Cys (C)</b>	Cisteína
<b>dHDL</b>	HDL discoidal
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de luz
<b>DMPC</b>	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DOPC</b>	1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
<b>DTNB</b>	5,5'-Ditiobis(Ácido 2-nitrobenzoico)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGB</b>	Buffer EQB suplementado con GdHCl y BME
<b>EPR</b>	Espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones
<b>EQB</b>	Buffer de equilibrio
<b>FC</b>	Colesterol libre
<b>FRET</b>	Transferencia de energía de resonancia de Förster
<b>GdHCl</b>	Cloruro de guanidinio
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HDX</b>	Intercambio hidrógeno-deuterio
<b>HX</b>	Intercambio de hidrógeno
<b>IDL</b>	Lipoproteína de densidad intermedia
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>ITC</b>	Calorimetría de titulación isotérmica
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LCAT</b>	Lecitina-colesterol aciltransferasa
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LDL-R</b>	Receptor de LDL
<b>Leu (L)</b>	Leucina
<b>LUV</b>	Vesículas unilamelares grandes
<b>Lys (K)</b>	Lisina
<b>MD</b>	Dinámica molecular
<b>MLV</b>	Vesículas multilamelares
<b>MS</b>	Espectroscopia de masas

<b>NPM</b>	N-(1-Pirenil)maleimida
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Buffer fosfato-salino
<b>PBSDG</b>	Buffer fosfato-salino suplementado con DMSO y GdHCl
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Phe (F)</b>	Fenilalanina
<b>PLTP</b>	Proteína transportadora de fosfolípidos
<b>POPC</b>	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
<b>RCT</b>	Transporte reverso del colesterol
<b>rHDL</b>	HDL reconstituida
<b>SANS</b>	Dispersión de neutrones a bajos ángulos
<b>SAXS</b>	Dispersión de rayos X a bajos ángulos
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>sHDL</b>	HDL esférica
<b>SOB</b>	Medio de cultivo de crecimiento súper óptimo
<b>SOC</b>	Medio de cultivo SOB con represión de catabolito
<b>SR-BI</b>	Receptor <i>Scavenger</i> clase B tipo I
<b>SSE</b>	Suma total de residuos
<b>SUV</b>	Vesículas unilamelares pequeñas
<b>TB</b>	Buffer de transformación
<b>TBS</b>	Buffer tris-salino
<b>TBSE</b>	Buffer tris-salino suplementado con EDTA, GdHCl y azida de sodio
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato
<b>TG</b>	Triacilgliceroles
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>Trp (W)</b>	Triptófano
<b>Tyr (Y)</b>	Tirosina
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad
<b>XL</b>	Entrecruzamiento químico

## Resumen

La apolipoproteína A-I (apoA-I) es la proteína mayoritaria de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), a las que se les atribuyen propiedades antiaterogénicas por su papel en el transporte reverso del exceso de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado para su catabolismo y eliminación.

En los ensayos realizados que se describen a lo largo de este trabajo, diferentes mutantes de cisteína de apoA-I fueron diseñadas, purificadas y marcadas en conjunto con otras previamente empleadas en el laboratorio. La sonda fluorescente pireno se introdujo en posiciones correspondientes a las caras hidrofóbicas e hidrofílicas de las hélices H4, H5 y H10. Se caracterizó la estabilidad estructural y funcional de estas variantes mutantes marcadas para validar los modelos para este estudio. Explotando las propiedades multiparamétricas de la sonda pireno la relevancia de las hélices H5 y H10 en eventos de auto-asociación de apoA-I en solución se evidenció, resaltando su participación en regiones de contacto durante ciertos pasos de oligomerización. Estos eventos fueron luego evaluados mediante el desarrollo de distintos modelos de asociación de equilibrio único y múltiple, donde más de un evento fue observado, destacándose la formación temprana de dímeros que sería la unidad mínima y funcional con capacidad de generar HDL discoidales (dHDL). La relevancia de estas posiciones fue también estudiada en entornos lipídicos donde no tuvieron gran utilidad; con la excepción de complejos de HDL generadas *in vitro*, en particular con una mutante de la hélice H5, como así también en HDL generadas *in vivo* por macrófagos THP-1.

En conclusión, el arreglo temprano de ciertas estructuras oligoméricas en solución puede influir en el desarrollo de estructuras más complejas como son las dHDL. Más estudios son necesarios para poder comprender mejor las funciones estructurales que cumplen apoA-I en sus distintas formas oligoméricas, que podrían tener importantes aplicaciones en áreas diversas como medicina y la industria biotecnológica.

Esta página se encuentra en blanco



## Abstract

Apolipoprotein A-I (apoA-I) is the main protein of high-density lipoproteins (HDL), to which antiatherogenic properties are attributed through its role in the reverse transport of cholesterol excess from peripheral tissues to the liver for catabolism and disposal.

In experiments described throughout this work, different cysteine mutant variants of apoA-I were designed, purified and labelled together with others previously employed in the laboratory. The fluorescent probe pyrene was introduced at positions corresponding to the hydrophilic and hydrophobic faces on helices H4, H5 and H10. Structural and functional stability of these labelled mutant variants were characterized to validate the models for this study. Exploiting the multiparametric properties of pyrene, the relevance of different helices H5 and H10 in self-association events of apoA-I in solution were evidenced, highlighting their participation in contact regions during certain oligomerization steps. These events were evaluated through the development of different association models for a unique or multiple events, where more than one equilibrium was observed, emphasizing the early formation of dimers which would serve as the minimal functional unit with the capacity to form discoidal HDLs (dHDLs). The relevance of these positions were also studied in lipid environments where they did not have great utility; with the exception of HDL complexes generated *in vitro*, particularly in the case of one mutant of helix H5, as well as in HDL generated *in vivo* by THP-1 macrophages.

In conclusion, early arrangements of certain oligomeric structures in solution can influence the development of more complex structures, such as dHDL. More studies are necessary to better understand the structural functions that apoA-I perform in its supramolecular structures, but these could have important applications in multiple areas, such as medicine and the biotechnological industry.

Esta página se encuentra en blanco

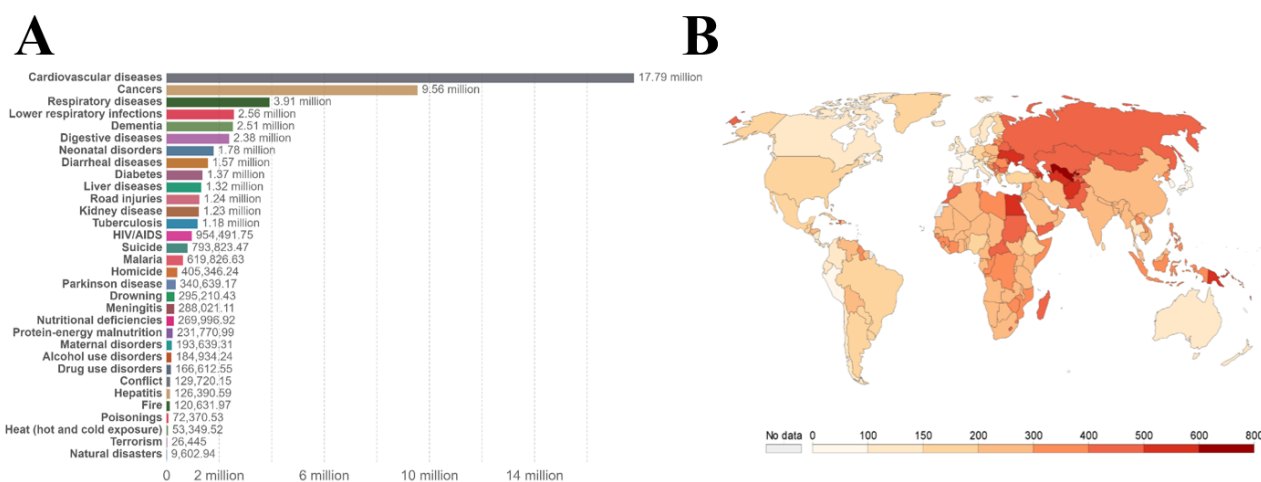
# **Capítulo 1:**

# **INTRODUCCIÓN**

Esta página se encuentra en blanco

## 1.1 Enfermedades cardiovasculares

La enfermedad cardiovascular (CVD, por sus siglas en inglés) es el término utilizado para referirse al conjunto de enfermedades que afectan al corazón y los vasos sanguíneos. Esta es la principal causa de muerte a nivel mundial (**Figura 1.1 A**). En el año 2017 se estimó ~ 17,8 millones de muertes, lo cual representó el 32 % de las muertes registradas ese mismo año [1]. Las CVD afectan en mayor medida a países de bajos y medios ingresos (**Figura 1.1 B**), donde más del 80 % de las defunciones se localizan en estos países. Se observó también que el porcentaje de muertes varía con la edad, siendo de 64 % para personas > 70 años, ~ 30 % de entre 50 y 69 años y el resto para personas entre 15 y 49 años, (las muertes para menores de 14 años se consideraron despreciables). Finalmente, en nuestro país, se reportaron valores similares, con alrededor de 10000 muertes al año.



**Figura 1.1: Defunciones por CVD y distribución demográfica.** Censo mundial realizado en el año 2017. A) Número de muertes por causa. B) Número anual de muertes por CVD cada 100000 habitantes. Figuras adaptadas del reporte *Global Burden of Disease* de la revista médica *The Lancet* 2017 [1] de la fuente <https://ourworldindata.org/causes-of-death>.

Las CVD pueden ser clasificadas de forma sencilla y práctica según la localización anatómica de las arterias afectadas en: enfermedad coronaria (CHD), enfermedad vascular periférica y enfermedad cerebrovascular (**Tabla 1.1**). El principal detonante (existen otros factores) que lleva al desarrollo de estas enfermedades es la acumulación anormal de lípidos en las paredes vasculares de

las arterias. Esta condición lleva al desarrollo de la aterosclerosis, ampliamente estudiada por sus implicancias, que se desarrollará en detalle en la siguiente sección.

**Tabla 1.1: Clasificación de las enfermedades cardiovasculares**

Tipo principales de CVD	Enfermedad
Enfermedad coronaria	<ul style="list-style-type: none"><li>• Angina crónica (arterias cardíacas parcialmente obstruidas)</li><li>• Insuficiencia cardíaca (bombeo deficiente de sangre rica en oxígeno al cuerpo)</li><li>• Cardiopatía coronaria (estrechamiento de los vasos sanguíneos que suministran sangre y oxígeno al corazón)</li><li>• Infarto agudo de miocardio (necrosis miocárdica por obstrucción de flujo sanguíneo que puede llevar a la muerte del paciente)</li></ul>
Enfermedad vascular periférica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hipertensión (presión arterial alta)</li><li>• Insuficiencia renal (los riñones pierden la capacidad de filtrar los desechos de la sangre)</li><li>• Claudicación en extremidades (dolor causado debido a un reducido flujo sanguíneo)</li></ul>
Enfermedad cerebrovascular	<ul style="list-style-type: none"><li>• Apoplejía (pérdida de la circulación sanguínea al cerebro)</li><li>• Embolia cerebral (tipo de infarto cerebral)</li><li>• Infarto cerebrovascular o derrame cerebral (necrosis cerebral que puede llevar a la muerte del paciente)</li></ul>

---

La clasificación se llevó a cabo en función de la localización de las arterias afectadas.

---

## 1.2 Aterosclerosis

La aterosclerosis es un estado de inflamación crónica caracterizado por la formación de placas aterogénicas, depósitos semisólidos que resultan de la acumulación de macrófagos ricos en colesterol en el espacio de la íntima (capa interior de la pared arterial), que sin ser tratada lleva a desarrollar un mayor riesgo de CHD [2,3]. La aterosclerosis inicia como pequeñas lesiones vasculares, comúnmente encontradas en individuos jóvenes, que con la edad pueden desaparecer o transformarse en placas aterogénicas, esta última la más frecuente [3]. Estas placas se componen principalmente de lípidos neutros como el éster de colesterol (CE), restos celulares apoptóticos, tejido conectivo y células del sistema inmune/inflamatorio incluyendo macrófagos y células T [2,3]. El desarrollo de estas placas y su posterior desprendimiento es la principal causa de los síntomas observados en pacientes. Este proceso es complejo, pero puede ser dividido en cuatro etapas: 1)

iniciación de la lesión, 2) infiltración monocítica y diferenciación, 3) progresión de la lesión y 4) ruptura de placa. Brevemente, estas son descritas a continuación.

### **1) Iniciación de la lesión:**

La iniciación de la lesión en el espacio de la íntima se cree que ocurre en sitios de perturbación endotelial tales como 1) lesión en el vaso y 2) flujo sanguíneo turbulento. Ambos procesos llevan a una posterior infiltración de lipoproteínas, en especial las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [4,5]. Aunque existe controversia en si la inflamación precede a la lesión, está claro que existe una relación entre ambos procesos. Por otro lado, ya que la velocidad de infiltración está directamente relacionada con la concentración plasmática de LDL ricas en CE (LDL-CE), su concentración es un indicador más del desarrollo de la aterosclerosis [5]. Cuando la infiltración de LDL-CE tiene lugar, un proceso inflamatorio comienza y estas lipoproteínas pueden ser oxidadas y modificadas [6]. Este proceso resulta en la liberación de fosfolípidos oxidados y lisofosfolípidos en el espacio de la íntima. Estos lípidos bioactivos estimulan la expresión de moléculas adhesivas, proteínas quimiotácticas y citoquinas en células endoteliales adyacentes facilitando la posterior adhesión celular de monocitos del torrente sanguíneo [7].

### **2) Infiltración monocítica y diferenciación:**

Los monocitos circulantes se adhieren al endotelio lesionado vía receptores de adhesión molecular y proteínas quimiotácticas, y rápidamente ingresan al espacio de la íntima [8]. En este lugar las citoquinas presentes promueven: 1) la diferenciación de monocitos en macrófagos, 2) la expresión de receptores *scavenger* (SR) y 3) la internalización de LDL modificadas [9,10]. Luego el CE de las LDL-CE es internalizado a través de receptores SR por macrófagos, cuya expresión se ve incrementada por LDL oxidadas [11] un tipo de LDL modificada. Además, en placas aterogénicas ya establecidas se ha observado que el receptor SR-BI, un miembro de la familia SR clase B tipo I

comúnmente encontrado en adipocitos, es abundante. Como resultado, los macrófagos del espacio de la íntima acumulan cantidades anormales de colesterol libre (FC) y CE. Finalmente, estos se transforman en células espumosas (o *foam cells*) que son los constituyentes principales de las denominadas estrías de grasa (o *fatty streaks*).

### **3) Progresión de la lesión:**

El entorno inflamatorio generado por las *fatty streaks* de formación temprana activan células T, produciendo aún más citoquinas pro- y anti-inflamatorias, que potencian aún más la aterosclerosis [12,13]. La transición de una estría a una placa depende de un ciclo inflamatorio continuo de activación de células T y de macrófagos. Este ciclo continuo termina produciendo: 1) una migración de células del músculo liso, 2) una formación adicional de *foam cells* y 3) la producción de una matriz extracelular de proteínas que forman una cápsula fibrosa sobre la placa protruyendo al lumen de la arteria. De esta manera, estas condiciones llevan al desarrollo de una placa madura con un núcleo de lípidos insolubles y restos celulares apoptóticos.

### **4) Ruptura de la placa:**

Aunque el desarrollo de una placa aterosclerótica madura por sí misma puede traer complicaciones a la salud como por ejemplo la hipertensión, su ruptura puede causar la muerte a través del infarto agudo de miocardio. Estos procesos inician con una cascada de señalización cuando el material trombótico, material que da origen al trombo, debajo de la placa fibrosa se pone en contacto con la sangre. Luego la adhesión plaquetaria y la formación del trombo eventualmente ocluye el flujo sanguíneo. Placas avanzadas pueden desarrollar a través de un número de pequeñas rupturas y eventos trombóticos una estrechez de la pared arterial previa a una mayor ruptura. Además, se ha observado que la estabilidad de una lesión aterosclerótica depende de la integridad de la cápsula. De este modo, lesiones con una delgada cápsula o un núcleo necrótico grande son



particularmente susceptibles a una ruptura. La *shoulder region* donde los extremos de la cápsula se unen con la pared arterial es un sitio frecuente de ruptura y una acumulación de *foam cells* son encontradas comúnmente en esta área. La secreción de metaloproteasas por *foam cells* cercanas a la *shoulder region* puede resultar en una degradación de la cápsula fibrosa y llevar a una ruptura de placa, que en el peor de los casos puede causar la muerte.

### 1.2.1 Causas que llevan al desarrollo de la aterosclerosis

El desarrollo de la aterosclerosis puede ser atribuida al incremento anormal en sangre de los niveles de CE y triacilgliceroles (TG), afección conocida en su conjunto como hiperlipidemia. A su vez, estas pueden dividirse en: hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, estos actuando como marcadores de riesgo para CVD basados en estudios epidemiológicos. El incremento en estos lípidos puede provenir de dos fuentes: 1) desórdenes alimenticios, que cuadra en el marco del denominado síndrome metabólico, por ejemplo: mala alimentación, obesidad, sedentarismo, diabetes mellitus tipo 2, *etc.*; y 2) alteraciones genéticas en aquellos mecanismos que regulan los niveles de CE y TG. Ejemplos de estos últimos son: deficiencia en Lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), enfermedad de Tangier, *etc.*

Existen factores adicionales asociados con el desarrollo de la aterosclerosis, como por ejemplo: la hiperglucemia y la glicación de productos (asociada a la diabetes tipo II), en los cuales el riesgo de CVD asociado es cuatro veces mayor [2]. Asimismo, la disrupción del sistema inmune por agentes infecciosos y una hiperhomocisteinemia (presencia de un aminoácido derivado de la cisteína en sangre) también se asocian con un alto riesgo a sufrir CVD [14].

Estudios epidemiológicos apuntan a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) como el principal componente que ofrece protección contra la aterosclerosis y las CHD [15]. Su nivel plasmático está inversamente relacionado con el riesgo de presentar aterosclerosis y las CHD. Este

actuando como marcador negativo de riesgo aterogénico. Los mecanismos propuestos para su rol protector son los siguientes:

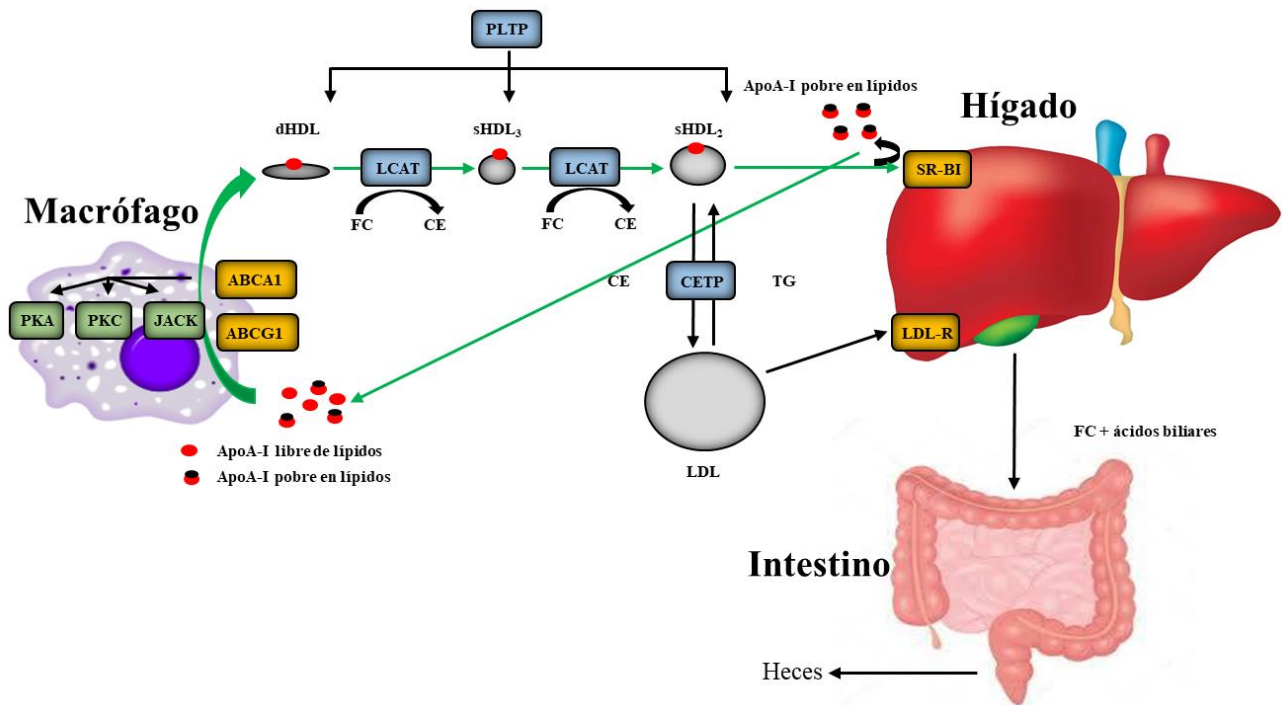
- Las HDL son transportadores de vitaminas antioxidantes (tales como el  $\alpha$ -tocofenol o la Vitamina E), que ayudan a proteger las células de los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno [16,17].
- Las HDL viajan asociadas con enzimas, tales como la paraoxonasa-1 y el factor activador de plaquetas acilhidrolasa, que juegan un rol importante en la remoción de lípidos oxidados en lipoproteínas, principalmente en LDL [18–20].
- Las HDL también desencadenan eventos de señalización que llevan a diversas respuestas celulares. Las más estudiadas son la activación de la sintasa endotelial de óxido nítrico y la protección de las paredes vasculares contra la apoptosis. Este último proceso ha sido asociado como fuerte protección contra la aterosclerosis [21–23].
- Las HDL están implicadas en el transporte reverso de lípidos oxidados, derivados de células y lipoproteínas hacia el hígado para su catabolismo y eliminación [24].
- Finalmente, el mayor efecto protector de las HDL, y el más estudiado, es el atribuido al transporte reverso del colesterol (RCT). Hasta la fecha la vía del RCT continúa siendo uno de los principales mecanismos por el cual las HDL confieren su rol cardioprotectivo. Debido a que este mecanismo reduce los niveles de colesterol, el incremento de las HDL ha sido el principal blanco de estrategias terapéuticas. Esfuerzos en los últimos años han apuntado a entender los mecanismos fisiológicos y moleculares por el cual las HDL protegen contra la aterosclerosis.

### 1.3 Transporte reverso del colesterol

El RCT es un proceso que involucra varias etapas y concluye con la remoción neta del exceso de colesterol de los tejidos periféricos, estos últimos adquiridos de la dieta mediante lipoproteínas de densidad intermedia, baja y muy baja (IDL, LDL y VLDL, respectivamente). Su destino final es el hígado vía el transporte mediado principalmente por las HDL. En definitiva, este proceso es de gran relevancia ya que el tejido periférico no puede catabolizar un exceso de colesterol y su acumulación puede llevar al desarrollo de múltiples enfermedades, en particular la aterosclerosis, como se ha mencionado [3].

La apolipoproteína A-I (apoA-I) es la proteína mayoritaria de las HDL y cumple una función vital (estructural y funcional) en el RCT. Esta provee flexibilidad estructural a las HDL permitiéndoles adquirir múltiples conformaciones necesarias para su función. Entre estas se encuentran las siguientes: apoA-I libre de lípidos (*lipid-free apoA-I*), apoA-I pobre en lípidos (*lipid-poor apoA-I*), HDL discoidales (dHDL) y HDL esféricas (sHDL). A estas dos últimas también se las conoce como  $\beta$ -HDL y  $\alpha$ -HDL, de acuerdo con su clasificación en base a su movilidad en geles electroforéticos. Finalmente, apoA-I actúa como receptor estructural para diversas enzimas o ligando de receptores celulares, tales como el transportador dependiente de adenosín trifosfato (ATP) sub-familia A miembro 1 (ABCA1), LCAT, CETP, VLDL/IDL/LDL, SR-BI y la lipasa hepática, entre otras [3,15] (ver detalles más adelante). A causa de todas estas conformaciones que puede adquirir apoA-I, esta proteína ha sido objeto de estudio para lograr comprender las bases moleculares del rol protector del RCT.

El RCT es un proceso que puede ser dividido en cuatro etapas: 1) eflujo del colesterol de las células periféricas; 2) maduración de las dHDL cargadas con colesterol a sHDL; 3) remodelado y transporte de las sHDL al hígado; y 4) excreción del colesterol y regeneración de las dHDL y apoA-I libre o pobremente asociada a lípidos (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2: Ciclo del RCT.** El ciclo del RCT se muestra en forma simplificada con sus componentes más relevantes: apoA-I en sus diferentes estados, receptores y proteínas plasmáticas. ApoA-I se representa como un círculo rojo en sus distintas asociaciones (libre, asociada con lípidos, dHDL, sHDL<sub>3</sub> y sHDL<sub>2</sub>). **ApoA-I**, apolipoproteína A-I; **CE**, éster de colesterol; **CETP**, proteína transportadora de éster de colesterol; **FC**, colesterol libre; **HDL**, lipoproteína de alta densidad; **LCAT**, lecitina colesterol aciltransferasa; **LDL-R**, receptor de LDL; **SR-BI**, receptor *scavenger* de clase B tipo I; **TG**, triacilgliceroles; **ABCA1** y **ABCG1**, transportadores dependientes de ATP sub-familias A y B miembros 1, respectivamente.

### 1) Eflujo de colesterol:

El primer paso del RCT implica la síntesis de aceptores lipoprotéicos (dHDL) que son los encargados de aceptar el FC proveniente de membranas celulares de tejidos con abundancia en este lípido. Este proceso inicia con la síntesis de apoA-I en su forma libre de lípidos, principalmente en el hígado, y continúa luego con su liberación al torrente sanguíneo, permitiendo así a esta proteína viajar hacia los tejidos periféricos y formar dHDL. La síntesis de esta lipoproteína se lleva a cabo por el receptor ABCA1, mutado en la enfermedad de *Tangier* [25], localizado en la membrana plasmática de varios tejidos tales como el hígado y el intestino, y en macrófagos, principalmente en este último. Este receptor se activa por una interacción directa entre apoA-I y ABCA1 [26], que origina una cascada de señalización mediada por proteínas quinasas, tales como PKA [27], PKC

[28,29] y JAK2 [30]. Esta activación origina una acumulación localizada de receptores ABCA1 en forma de *clusters* en la membrana plasmática que luego desencadena una acumulación de fosfolípidos y FC, debido a la actividad flipasa o translocasa de ABCA1, proceso que es impulsado por la hidrólisis de ATP [31]. Finalmente, esta acumulación de lípidos causa una compresión de las moléculas de fosfolípidos en la cara externa de la membrana plasmática, generando así cambios de curvatura que actúan como sustratos ideales para la microsolvubilización por apoA-I y en consecuencia la síntesis *de novo* de dHDL [32].

Una vez formadas las dHDL, estas adquieren FC de las membranas plasmáticas de los tejidos periféricos con abundancia de este lípido. Esta adquisición se lleva a cabo por medio de receptores de membrana tales como el transportador dependiente de ATP sub-familia G miembro 1 (ABCG1) y SR-BI, generando así dHDL ricas en FC (dHDL-FC). Además, variaciones en la composición lipídica en las curvaturas de membrana puede causar heterogeneidad en la generación de dHDL-FC, en términos del contenido de FC. De esta manera, se generan las dHDL-FC, que son los sustratos ideales para formar las sHDL-CE. Cabe recalcar que la activación de los transportadores ABCA1 y ABCG1 (entre otros) se lleva a cabo en forma simultánea y la síntesis de dHDL-FC termina siendo un proceso complejo.

## 2) **Maduración de las dHDL:**

La segunda etapa del RCT involucra un primer paso de maduración de las dHDL-FC desde su forma discoidal hacia una forma esférica (sHDL-CE). Este proceso inicia con una asociación directa entre la enzima plasmática LCAT [33] y la dHDL-FC, esta última proveniente de la síntesis *de novo* (etapa 1) o de procesos de remodelado (acción por la PLTP, ver etapa 3 más adelante). La enzima LCAT es sintetizada en el hígado y liberada al torrente sanguíneo y modula la transferencia del ácido graso de la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina hacia el FC, generando así el lípido neutro CE y lisofosfatidilcolina [33]. De esta manera, la enzima LCAT lleva a cabo la esterificación del FC a CE

en la dHDL que da lugar a un movimiento del CE de la superficie hacia su interior, generando así el núcleo maduro e hidrofóbico característico de las sHDL. Este proceso de esterificación y conversión de dHDL  $\rightarrow$  sHDL tiene lugar en dos etapas generando distintos grados de esterificación. Primero, se generan sHDL de diámetros entre 7,6 y 8,4 nm, clasificadas como sHDL<sub>3</sub> (HDL pequeñas, que a su vez se diferencian en HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>, de diámetros decrecientes: 8,4, 8 y 7,6 nm, respectivamente [34]). Luego las sHDL<sub>3</sub> se convierten en sHDL<sub>2</sub> (clasificadas en HDL<sub>2a</sub> y HDL<sub>2b</sub> con diámetros de 9,2 y 10,6 nm, respectivamente) con un núcleo mayor de CE y por lo tanto de menor densidad, donde estas últimas son aquellas especies con mayor capacidad de transportar su CE. De esta manera, la actividad de la proteína LCAT sobre las dHDL-FC producen sHDL que viajan al hígado para eliminar el CE que transportan.

### 3) Remodelación en sHDL:

Las sHDL generadas en un paso previo de activación por LCAT sufren varios procesos de remodelación que las preparan, en términos de estabilidad, para su transporte al hígado o permiten que estas actúen como fuente de CE para otras lipoproteínas [3]. Las dos principales proteínas involucradas en estos procesos son las proteínas transportadoras de CE y fosfolípidos (CETP y PLTP, respectivamente). Por un lado, la CETP intercambia en forma bidireccional TG y CE entre HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>, mecanismo denominado transferencia homotípica [35]. Además, por un mecanismo adicional denominado transferencia heterotípica se intercambian TG por CE entre HDL y VLDL/IDL/LDL, donde esta actividad proporciona el TG encontrado en las sHDL [36]. En estos dos tipos de transferencias, ambos procesos son dependientes del gradiente de concentración de estos ligandos. Por otro lado, la PLTP proporciona los fosfolípidos necesarios para estabilizar las sHDL por medio de un mecanismo de intercambio de fosfolípidos entre HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>. Este proceso regenera dHDL que reinicia la segunda etapa de maduración de las dHDL. Finalmente, se ha encontrado en menor medida que la lipasa hepática y la lipasa endotelial participan en estos procesos

de remodelado. Estas lipasas se encuentran asociadas al endotelio vascular y juegan un rol importante en la remodelación de las HDL por hidrólisis de los fosfolípidos en sub-fracciones de HDL. Es así que estos procesos de remodelación preparan las sHDL para el último paso del RCT, que es la captación del colesterol por el hígado.

#### **4) Remoción de colesterol por el hígado:**

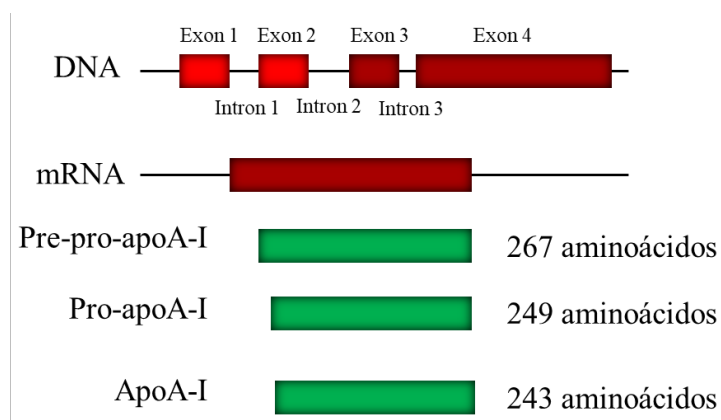
Esta última etapa del RCT consiste en la captación del CE de las sHDL por células hepáticas. Este proceso se ha denominado captación selectiva, ya que se distingue de la observada en lipoproteínas conteniendo la apolipoproteína B y receptores de LDL (LDL-R), donde en este proceso el complejo LDL y su receptor son degradadas por lisosomas durante su internalización en hepatocitos. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la internalización de CE por HDL involucra al receptor de membrana hepático SR-BI. Finalmente, en este proceso se recicla apoA-I en su forma pobre en lípidos que viaja por el torrente sanguíneo y puede nuevamente comenzar el ciclo del RCT.

## **1.4 Proteína mayoritaria de las HDL: apolipoproteína A-I**

### **1.4.1 ApoA-I monomérica**

El gen que codifica la forma madura de la apoA-I humana (APOA1) se encuentra en un segmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) dentro del cromosoma 11q23-q24 organizado en cuatro exones y tres intrones. ApoA-I es un polipéptido de 243 aminoácidos de ~ 28 kDa que carece de glicosilaciones y puentes disulfuros. Esta es sintetizada principalmente por hepatocitos y enterocitos como respuesta a determinadas señales fisiológicas. ApoA-I se sintetiza como pre-pro-proteína, donde el exón 3 codifica los primeros 43 aminoácidos, mientras que la región remanente es codificada por el exón 4 (residuos 44-243) [37]. La forma madura se obtiene por dos

clivajes, la primera previa a la secreción y la segunda por acción de dos proteasas: la *procollagen-C-proteinase enhancer-2* y la *bone morphogenetic protein-1* (**Figura 1.3**).



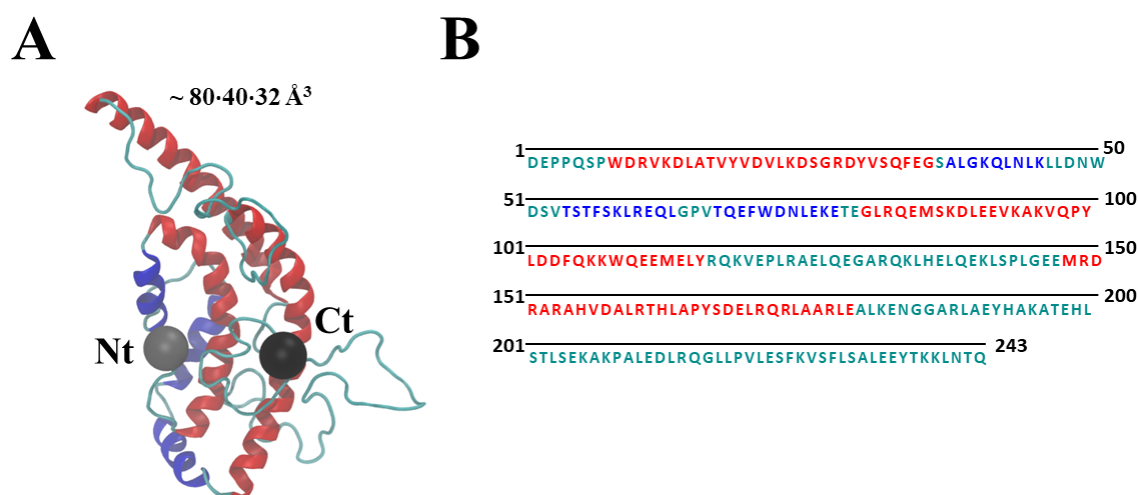
**Figura 1.3: Estructura primaria de apoA-I.** Organización de exones e intrones dentro del gen de apoA-I (nombre del gen, APOA1) en la región 11q23-q24 del cromosoma 11 [37]. En rojo se muestran los componentes nucleotídicos (rojo oscuro, exones 3 y 4) y en verde los polipeptídicos.

En solución acuosa la forma libre de lípidos de apoA-I adquiere principalmente dos tipos de estructura secundaria:  $\alpha$ -hélice-anfipática y *random-coil* [38,39], aunque algunos autores proponen también una corta región desde los aminoácidos 209 a 219 con estructura hoja- $\beta$  [38]. Esta última conteniendo un promedio de estructura  $\alpha$ -hélice alrededor de  $52 \pm 6$  % [40].

La obtención de un modelo de apoA-I por los métodos convencionales, tales como cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear, no ha sido posible debido a la naturaleza dinámica de apoA-I. Esta fluctúa entre múltiples conformaciones y sus distintos estados de asociación (ver **Sección 1.4.2**). Únicamente existen modelos de baja resolución obtenidos por técnicas de entrecruzamiento químico y espectroscopia de masas (XL-MS), y modelos computacionales (predicciones) por homología y dinámica molecular (MD) [41–44]. A pesar de estas dificultades se ha llegado a un modelo consenso, propuesto por *Melchior et al.* 2017 [40], para la forma monomérica libre de lípidos. Este modelo fue resuelto utilizando una combinación de diversas técnicas tales como dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS), intercambio hidrógeno-deuterio (HDX), restricciones en distancias moleculares a partir de experimentos por XL-MS, propios del



autor y de aquellos publicados en bibliografía, y datos cristalográficos (**Figura 1.4**). En este modelo, apoA-I se organiza como una proteína globular con dimensiones de  $\sim 80 \cdot 40 \cdot 32 \text{ \AA}^3$  y con una composición estructural de 50%/50% de  $\alpha$ -hélice/*random coil*. Se distinguen tres  $\alpha$ -hélices principales: H1 (residuos 8-35), H5 (81-115) y H6 (148-179); y tres  $\alpha$ -hélices cortas que se intercalan entre las principales: H2 (37-45), H3 (54-64) y H4 (68-78). El resto de la estructura se compone de *random-coil* con dos regiones principales que abarcan los residuos 116-147 y 180-243. Finalmente, sobre la base de experimentos por dicroísmo circular y el análisis secuencial (ver sección más adelante), la secuencia y estructura de apoA-I se ha organizado en tres regiones [45]: 1) la región N-terminal (residuos 1-57), que constituye una estructura poco definida y que es esencial para mantener la conformación nativa de apoA-I; 2) la región central (residuos 60-183), que se compone de  $\alpha$ -hélices anfipáticas importantes para la activación de LCAT y la unión a lípidos; y 3) la región C-terminal (residuos 187-243), que es altamente hidrofóbica y que se ha propuesto que es el sitio de unión a membranas fosfolípicas. Esta última nomenclatura será la utilizada para referirse a los distintos segmentos de apoA-I en solución acuosa.



**Figura 1.4: Modelo de apoA-I.** Se representa el modelo molecular consenso para la forma libre de lípidos de apoA-I propuesto por *Melchior et al.* 2017 [40]. A) Representación tridimensional con dimensiones de  $80 \cdot 40 \cdot 32 \text{ \AA}^3$ . B) Composición estructural a lo largo de su secuencia. En color rojo se representan las hélices H1 (residuos 8-35), H5 (81-115) y H6 (148-179); en color azul las hélices H2 (37-45), H3 (54-64) y H4 (68-78); y en color cian las regiones con estructura *ramdon coil*. Con esferas se resaltan los extremos N-terminal (Nt, color gris) y C-terminal (Ct, color negro).

## 1.4.2 ApoA-I oligomérica

ApoA-I en su forma libre de lípidos tiende a auto-asociarse en forma reversible en solución acuosa a concentraciones por encima de  $0,1 \text{ mg/ml}$  [46,47]. Esta auto-asociación es acompañada por una ganancia de alrededor de  $\sim 10 \%$ , en estructura secundaria tipo  $\alpha$ -hélice, como se registra por dicroísmo circular a  $1 \text{ mg/ml}$  [48]. Se supone que la forma monomérica es igual a la oligomérica. Podemos inferir esta relación a partir del diseño experimental en la obtención del primer modelo de apoA-I reportado por *Silva et al.* 2005 [41]. La estrategia en estos experimentos fue modelar por homología el monómero de apoA-I a partir de restricciones de distancia entre residuos obtenidas a partir de XL-MS en muestras de apoA-I. Como los autores reportan, fue un requisito fundamental trabajar con concentraciones de  $1 \text{ mg/ml}$  para obtener la masa suficiente de apoA-I previa a los experimentos por XL-MS. De esta forma, se deduce que la forma monomérica comparte semejanza con las unidades de apoA-I en su forma oligomérica.

El estudio de estos eventos de asociación fue abordado por primera vez por *Vitello et al.* 1976 por técnicas de ultracentrifugación analítica en el equilibrio (AUC) [47]. Sus resultados sugirieron la existencia de equilibrios múltiples entre los estados monómero, dímero, tetrámero y octámero, para un modelo de asociación discreta, donde la asociación es de la forma:  $2A \rightleftharpoons A_2$ ;  $4A \rightleftharpoons A_4$  y  $8A \rightleftharpoons A_8$  (donde “A” hace referencia a una unidad de apoA-I) [47,49–51]. Aunque recientes ensayos llevados a cabo por técnicas de fluorescencia [52], calorimetría de titulación isotérmica (ITC) [53], espectroscopia de dispersión de luz cuasielástica [46] y dispersión dinámica de luz (DLS) [54] han propuesto equilibrios de asociación alternativos. La siguiente tabla resume estos modelos y sus principales características (**Tabla 1.2**).

**Tabla 1.2: Modelos de asociación propuestos para apoA-I libre de lípidos**

Modelo de asociación	Esquema de asociación	Técnica
Discreta [47,50]	$2A \rightleftharpoons A_2$ ; $4A \rightleftharpoons A_4$ ; $8A \rightleftharpoons A_8$	AUC
Asociación de dímeros [46]	$2A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_8$	QLS
Indefinida por adición de dímeros [52]	$2A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	Anisotropía de fluorescencia y <i>homoquenching</i>
Indefinida por adición de monómeros [52–54]	$2A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_5 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_7 \rightleftharpoons A_8$	ITC y DLS

Representación de los modelos de asociación más relevantes descritos en apoA-I. Se asigna a cada modelo un nombre que se mantendrá a lo largo de esta Tesis Doctoral. **AUC**, ultracentrifugación analítica; **QLS**, espectroscopia de dispersión de luz cuasielástica; **ITC**, calorimetría de titulación isotérmica; y **DLS**, dispersión dinámica de luz.

Las interacciones entre sub-unidades en un oligómero es de naturaleza hidrofóbica y electrostática a temperatura fisiológica ( $\sim 37^\circ\text{C}$ ) [50,55]. Se observa un incremento en la auto-asociación de apoA-I cuando se reduce la polaridad del medio desde un buffer fosfato hacia un buffer propanol-fosfato, y por un incremento en la fuerza iónica del medio (fuerza iónica final 0,51). Asimismo, estas interacciones, y por consiguiente el fenómeno de auto-asociación, dependen de la temperatura, observándose un máximo de auto-asociación a  $21^\circ\text{C}$  ( $\Delta H_{\text{asociación}} \sim 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) en ausencia de interacciones electrostáticas [54].

Como se mencionó previamente, la auto-asociación es un proceso que involucra distintos eventos de asociación, donde estudiar y comprender cada etapa es un proceso complejo. Diferentes

investigadores abordaron este problema evaluando la auto-asociación en etapas. La primera de estas corresponde al primer evento de asociación (la formación del dímero), y la segunda engloba todos los eventos de asociación restantes. Esta aproximación arrojó diferentes interpretaciones: por un lado, *Donovan et al.* 1987 [46] con un modelo de asociación de la forma monómero  $\rightleftharpoons$  dímero  $\rightleftharpoons$  octámero registraron la formación de un dímero de alta afinidad ( $\Delta G_{\text{dim}} = -39 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) que es seguido por asociaciones sucesivas de dímeros con baja energía ( $\Delta G_{\text{oligo}} = -7,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ); y por el contrario, *Schönfeld et al.* 2016 [53] con un modelo de asociación M3 reportaron una formación inicial de dímeros entrópicamente desfavorable, que constituye un paso de nucleación de baja energía libre ( $\Delta G_{\text{dim}} = -4,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  a 22 °C). En este último, una vez que se forma el dímero, este actuaría como soporte para la asociación sucesiva de monómeros, donde el proceso de crecimiento tiene una mayor afinidad ( $\Delta G_{\text{oligo}} = -7,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). De esta manera, estas observaciones resaltan la importancia del primer evento de asociación que es clave en el fenómeno de auto-asociación de apoA-I.

Se conocen dos regiones que parecen estar involucradas en los eventos de asociación en apoA-I. Por un lado, la primera de estas corresponde a la región C-terminal, donde su ausencia en la mutante apoA-I  $\Delta 190-243$  reduce, aunque no de forma completa, su capacidad de formar oligómeros como se registra por experimentos de entrecruzamiento químico seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (XL-SDS-PAGE) [56]. Esto sugiere que la auto-asociación de apoA-I estaría mediada en gran medida por la región C-terminal. Esta hipótesis es respaldada por un estudio reciente con una mutante quimera entre la apolipoproteína III (apoLp-III) de insecto y la región C-terminal de apoA-I humana (quimera apoLp-III-apoA-I  $\Delta 1-178$ ). Con esta quimera se observó oligomerización por XL-SDS-PAGE que estaba ausente en la proteína apoLp-III [57]. Además, se observó un resultado similar con mutantes de sustitución de residuos ácidos y básicos por neutros en apoA-I (posiciones: lisinas 195, 206, 208, 226, 238 y 238; y glutámicos 234 y 235). Estas sustituciones disminuyen la formación de oligómeros, como se registra por XL seguido de

exclusión molecular [58]. Por otro lado, el resto de la secuencia, que incluyen la región N-terminal y central de apoA-I, posee la capacidad de mostrar auto-asociación en forma independiente de la región C-terminal. Esto fue evidente con la mutante apoA-I  $\Delta$ 185-243 que registra la formación de dímeros por exclusión molecular [59]. Además, esta asociación depende de la polaridad del medio, registrado por experimentos de asociación en medios de distinta polaridad y XL-SDS-PAGE a diferentes concentraciones de proteína [55]. Es así que la auto-asociación de apoA-I no depende de una única región, existiendo distintas formas en la cual apoA-I puede formar oligómeros.

Con respecto a las regiones que mantienen una proximidad durante la auto-asociación de apoA-I, que podrían ser relevantes a nivel funcional, se conoce muy poco. Únicamente se ha obtenido información de estas regiones, de forma indirecta, estudiando apoA-I a concentraciones que permiten la formación de especies oligoméricas [38,39,41,60]. La **Tabla 1.3** organiza y resume estos resultados. En general, se puede inferir que la auto-asociación de apoA-I promueve la estabilización por asociación de segmentos de proteína que corresponden a las regiones N- y C-terminal. En base a estas observaciones, se han propuesto distintos modelos de asociación para la especie dimérica (la más sencilla de resolver) donde la asociación se llevaría a cabo a través de contactos intermoleculares entre regiones C-terminal [61]. Por otra parte, se han obtenido distintos modelos tridimensionales del dímero de apoA-I en ausencia de la región C-terminal. El primero de estos fue propuesto por *Mei et al.* 2011 [59] y el segundo por *Melchior et al.* 2016 [62], en ambos modelos la región reconstruida corresponde a los residuos 1-184.

**Tabla 1.3: Residuos y regiones involucradas en la auto-asociación de apoA-I**

<b>Autor</b>	<b>Regiones involucradas</b>	<b>Metodologías y condiciones</b>
<i>Oda et al.</i> 2003 [38]	L163 (hd); A176 (hd); G217 (hd); P209 (hd); K226C (hd.)	SD-SL-EPR; 5 y 0,5 mg/ml; 20-22 °C; buffer PBS
<i>Silva et al.</i> 2005 [41]	Nt-Nt; Nt-K77; Nt-K238; K208-K208; K208-K238; K226-K238-K238.	XL-MS; 1 mg/ml; buffer PBS (pH 7,8)
<i>Lagerstedt et al.</i> 2007 [39]	G26 (hd); L44 (hd); L65 (hd); S167 (hd)	SD-SL-EPR; 2,8 mg/ml; 20-22 °C; buffer PBS (pH 7,8)
<i>Chetty et al.</i> 2009 [60]	(212-222); (233-243)	HDX-MS; 1,2 mg/ml
<i>Prieto et al.</i> 2011 [52]	W@92; W@104; W@108	Anisotropía de fluorescencia y <i>homoquenching</i> < 0,1 mg/ml buffer PBS

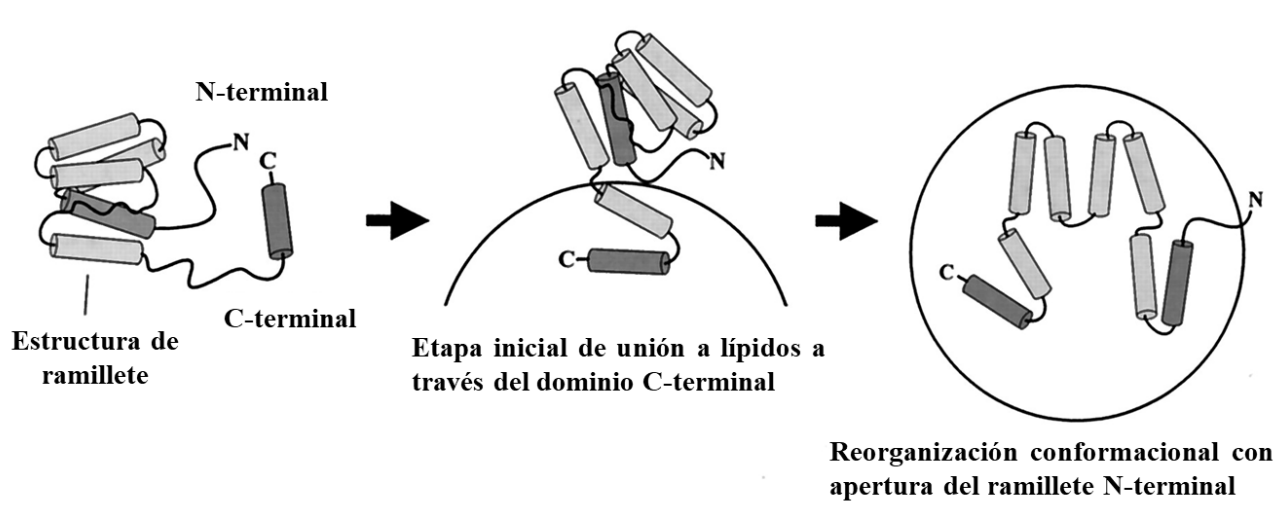
La tabla representa los residuos y las regiones aminoácidas que mantienen contactos entre sí durante la formación de oligómeros. También se especifican las técnicas y las condiciones experimentales utilizadas. **SD-SL-EPR**, espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica spin sitio-dirigida; **XL-MS**, espectroscopia de masas de entrecruzamiento químico; **HDX-MS**, espectroscopia de masas de intercambio hidrógeno-deuterio; **hd**, homodímero; **PBS**, buffer fosfato-salino; y **Nt**, N-terminal.

### 1.4.3 Unión de apoA-I a membranas lipídicas

Además de asociarse para formar oligómeros, apoA-I interacciona con membranas fosfolipídicas en una etapa previa a la formación de dHDL. En esta sección se describe el mecanismo por el cual apoA-I interacciona con lípidos y los cambios estructurales que esta sufre en el proceso.

Estudios con mutantes de eliminación progresiva de segmentos de proteína de apoA-I (mutantes utilizadas: apoA-I  $\Delta$ 1–43,  $\Delta$ 44–65,  $\Delta$ 44–126,  $\Delta$ 123–166,  $\Delta$ 190–243 y  $\Delta$ 223–243) han demostrado que la región C-terminal es esencial en la interacción con membranas fosfolipídicas, y que el resto de su estructura sufre cambios conformacionales durante este proceso [63]. Es así que *Saito et al.* 2003 [59] propusieron un modelo de interacción con membranas que se desarrolla en dos etapas (**Figura 1.5**). Primero, apoA-I se asocia a una superficie fosfolipídica a través de su región C-terminal (región que fluctúa entre dos tipos de estructura secundaria:  $\alpha$ -hélices y *random coil*, en particular los residuos 220-238 [38]), donde esta asociación es acompañada de un aumento del contenido  $\alpha$ -helicoidal en esta región [63]. Luego el resto de la proteína, compuesta principalmente por un ramillete de  $\alpha$ -hélices, sufre una apertura que convierte sus interacciones hidrofóbicas hélice-hélice en interacciones hélice-lípidos. Este modelo de dos etapas es consistente con mediciones calorimétricas de la unión de apoA-I [64] y péptidos modelos [65] a vesículas

fosfolípídicas, que indican que la unión a membrana es acompañada por una liberación de calor ( $\Delta H < 0$ ). Estas características, en la asociación de apoA-I a membranas fosfolípídicas, apoyan la idea general de que la fuerza impulsora en la asociación viene dada por la ganancia en estructura secundaria, en particular estructura  $\alpha$ -hélice [38]. Por otra parte, estudios en el laboratorio del Dr. Horacio Garda han mostrado una inserción en membrana de un ramillete de cuatro hélices provenientes de un dímero de apoA-I (residuos 77-120), en un arreglo que corresponde a una de las distintas configuraciones observadas en modelos *in vitro* de dHDL (configuración LL5/2, ver detalle más adelante) [52].



**Figura 1.5: Mecanismo de unión a lípidos de apoA-I.** Modelo de asociación a membranas fosfolípídicas propuesto por *Saito et al.* 2003 [63]. Figura adaptada de *Saito et al.* 2003 [59].

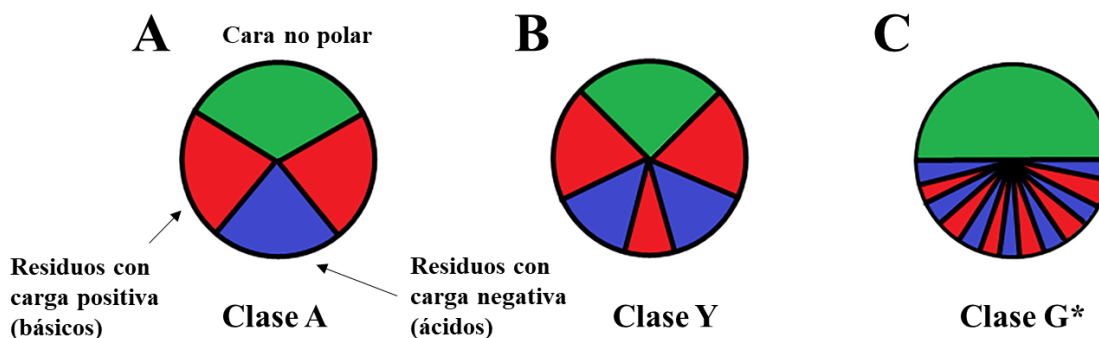
## 1.4.4 ApoA-I en HDL discoidales

### 1.4.4.1 Estructura secundaria

Una de las funciones estructurales más importantes de apoA-I es su capacidad de formar dHDL, un complejo fosfolípidos-proteína que tiene la habilidad de almacenar colesterol. Se cree que este proceso tiene lugar en la superficie de las membranas plasmáticas, donde apoA-I aprovecha ciertas irregularidades en la hemicapa externa para formar estas estructuras [66,67].

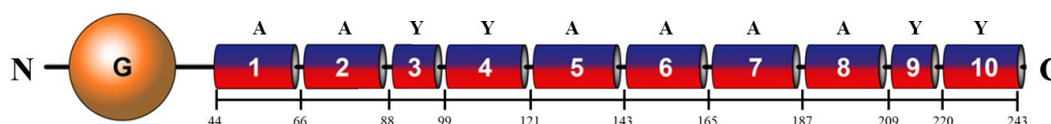
Experimentalmente, se han logrado reproducir estas partículas por medio de distintas técnicas, obteniéndose estructuras análogas o equivalentes denominadas HDL reconstituidas (rHDL). Esto ha ayudado a entender su estructura y los fundamentos que llevan a la formación de dHDL *in vivo* como sus funciones claves. La primera observación estructural en estas partículas fue el incremento significativo en estructura  $\alpha$ -hélice, lo que supone que la formación de estas estructuras es termodinámicamente favorable. A su vez, estos complejos son reproducibles en distintos tamaños para dos moléculas de apoA-I, las más estudiadas de 7,8 nm y 9,6 nm, manifestando así su alta flexibilidad conformacional. A partir del análisis de la distribución de residuos polares y no polares alrededor del eje en las hélices anfipáticas que puede adquirir apoA-I en rHDL, estas han sido clasificadas en tres clases diferentes: hélices tipo A, Y y G\* [68]. Las hélices de clase A son el principal motivo de unión a lípidos en apoA-I, como también en otras apolipoproteínas tales como la apolipoproteína A-IV y la apolipoproteína E. Esta clase de hélice se caracteriza por la localización de residuos básicos (con carga positiva) cerca de la interfase hidrofóbica/hidrofílica y residuos ácidos (con carga negativa) agrupados en la cara polar (**Figura 1.6 A**). Las hélices de clase Y se caracterizan por la agrupación de residuos básicos en la cara polar, con un patrón en forma de letra Y [69] (**Figura 1.6 B**). Por último, las hélices clase G\* han sido descritas como un arreglo al azar de residuos básicos y ácidos en la cara polar (**Figura 1.6 C**). Cabe recalcar que estas dos últimas clases de hélices (Y y G\*), identificadas en otras apolipoproteínas, tienen una reducida afinidad a lípidos en comparación con las hélices de clase A.





**Figura 1.6: Diferentes clases de  $\alpha$ -hélices descritas en apoA-I-dHDL.** La figura representa los distintos tipos de  $\alpha$ -hélices de apoA-I en rHDL [68]. Se describen tres clases de  $\alpha$ -hélices: A, Y y G\*, en función de la distribución de residuos cargados en la cara hidrofílica. Código de color: residuos con carga positiva (rojo), residuos con carga negativa (azul) y residuos hidrofóbicos (verde).

Tomando como base las observaciones mencionadas, *Segrest et al.* 1974 [70,71] propusieron una organización en estructura secundaria, que luego fue validada por técnicas experimentales (**Figura 1.7**). Esta inicia con una primera región (residuos 1-43), denominada G, codificada por el exón 3 del gen APOA1, que incluye una  $\alpha$ -hélice clase G\*, pero que se ha encontrado que adquiere una estructura más bien globular. Luego esta es seguida de una segunda región de 10  $\alpha$ -hélices anfipáticas repetidas en tándem, de 22 u 11 residuos cada una, codificadas por el exón 4 del gen APOA1. Cada una de estas hélices están organizadas y separadas de la siguiente manera: H1 [44-65], H2 [66-87], H3 [88-98], H4 [99-120], H5 [121-142], H6 [143-164], H7 [165-187], H8 [188-208], H9 [209-219] y H10 [220-243]. Para concluir, esta organización será utilizada a lo largo de esta Tesis para referirnos a determinados segmentos de proteína de apoA-I en solución o asociadas con lípidos (en membrana o en rHDL).



**Figura 1.7: Estructura secundaria de apoA-I en dHDL propuesta por *Segrest et al.* 1974 [70,71].** Los residuos 1-43 corresponden a la región G, mientras que los residuos 44-243 a 10  $\alpha$ -hélices anfipáticas de clase A e Y (H3 y H9, hélices de 11 aminoácidos y el resto de hélices de 22 aminoácidos).

### 1.4.4.2 Estructura terciaria

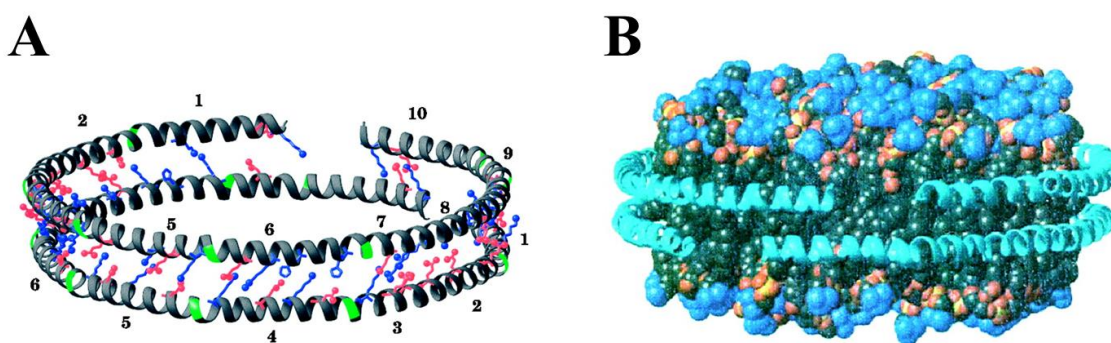
Las HDL poseen una vida media muy corta en plasma debido a que son excelentes sustratos de la LCAT [72] siendo difícil aislarlas y por lo tanto estudiarlas. En consecuencia, el conocimiento disponible acerca de estas estructuras proviene únicamente de estudios en rHDL. Estas exhiben muchas de las características típicas de las dHDL nativas, tales como activación de LCAT [73], transferencia de lípidos [74] y la unión a receptores [75]. A pesar de tener un método confiable de adquisición de dHDL, la caracterización estructural ha proporcionado resultados divergentes, no existiendo un único modelo. A continuación, se describen algunos de los modelos estructurales más importantes en rHDL que aportan información para comprender la relación estructura-función en estas.

#### 1) **Modelo rígido:**

La estructura de las rHDL fue inicialmente caracterizada entre los años 1986 y 1989 como una estructura en forma de disco (de ahí proviene el nombre de HDL discoidales), con dimensiones de  $\sim 9,6/4,7$  nm (diámetro/espesor), con dos moléculas de apoA-I, y conteniendo entre 150 y 200 moléculas de fosfolípidos de 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) [76,77]. Más tarde, *Borhani et al.* 1997 [78] lograron cristalizar una forma truncada de apoA-I (residuos 44-243), revelando una estructura de cinturón que propusieron sería la adoptada en dHDL. Finalmente, *Segrest et al.* 1999 [79] propusieron un modelo rígido consenso para esta estructura que se denominó modelo de doble cinturón (*double-belt model*) (**Figura 1.8**).

En el modelo de rHDL propuesto por *Segrest et al.*, dos moléculas de apoA-I, en un arreglo de 11/3 residuos por vuelta de estructura  $\alpha$ -hélice, se organizan en una conformación de tipo cinturón que encapsulan una porción de bicapa lipídica en una orientación antiparalela en la cual ambas hélices H5, una de cada molécula, se encuentran enfrentadas en una conformación que se denominó registro de hélice LL5/5 [79]. Este registro fue establecido a partir de la gráfica de las  $\alpha$ -hélices

H2-H9 de una molécula de apoA-I en rHDL en un diagrama de hélices, donde la gráfica resultante revela dos interfases que se denominaron *left* (L) y *right* (R) dependiendo de hacia dónde estas se agrupan, hacia la izquierda o hacia la derecha del gráfico, respectivamente. Considerando esto último, el modelo de rHDL propuesto por *Segrest* podría existir en dos arreglos (o configuraciones) distintos dependiendo de cómo estas regiones se apilan una con respecto a otra: *left to left* (LL) o *right to right* (RR), observándose que el arreglo LL, en una configuración LL5/5 (configuración simétrica), proporciona una mayor cantidad de puentes salinos y por lo tanto es la más estable en términos energéticos para la región 44-241 de apoA-I del modelo propuesto por *Segrest et al.*. Luego estudios por XL apoyaron este modelo, donde se observó el arreglo LL5/5 [80,81]. Finalmente, aunque una orientación LL parece ser la conformación preferencial de apoA-I en rHDL, estudios recientes no descartan otros arreglos, donde se ha observado que con una mutante de eliminación de la región central en apoA-I (residuos ausentes: 1-54 y 121-142) reveló un arreglo RR [82].



**Figura 1.8: Modelo rígido de rHDL.** Se representa un modelo estructural de rHDL propuesto por *Segrest et al.* 1999 [79]. A) Modelo en ausencia de lípidos, donde se aprecian los puentes salinos inter-hélices entre moléculas de apoA-I para una configuración LL5/5 (la configuración más estable). Las hélices son numeradas de 1 a 10, representando a los residuos con carga positiva y negativa en rojo y azul, respectivamente. B) Modelo en presencia de lípidos para la misma configuración alrededor del borde de un parche de 8,5 nm de diámetro de una bicapa POPC simulada por MD en la fase cristalina líquida. Las representaciones carecen de las regiones 1-43 y 241-243, no predichas en estructura  $\alpha$ -hélices. Figura adaptada de *Segrest et al.* 1999 [79].

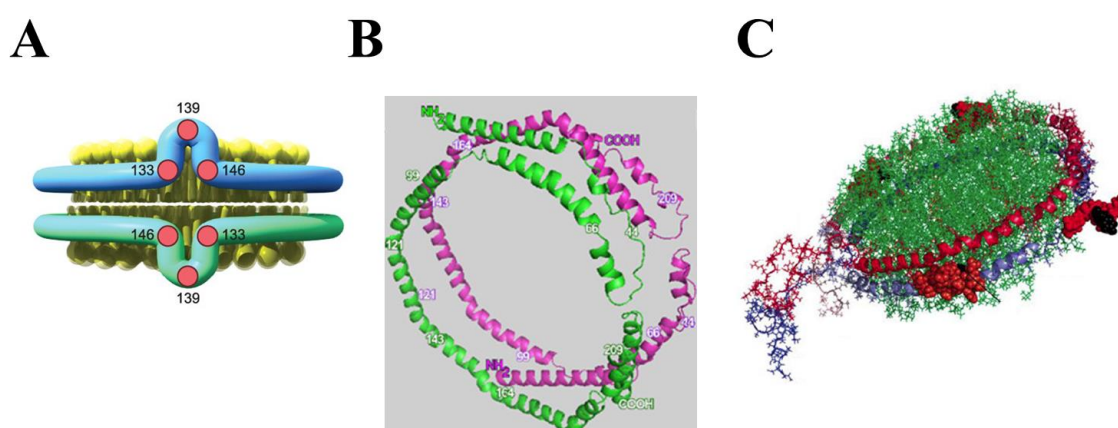
### 2) Modelos flexibles:

A pesar de que el modelo rígido propuesto por *Segrest et al.* es útil para entender algunos aspectos de su función, estudios posteriores revelaron cierto grado de flexibilidad en algunas de sus regiones, las cuales tendrían una función clave. A continuación, se describen algunas modificaciones que extienden el modelo de doble cinturón, proponiendo una mayor flexibilidad. La discrepancia en estos modelos no quiere decir que algunos de estos no sean válidos, sino que las condiciones y técnicas utilizadas para obtenerlos podrían estar registrando un estado conformacional estabilizado energéticamente por las condiciones del ensayo.

- *Looped-belt model (Figura 1.9 A)* es un modelo de partículas de rHDL de 9,4 nm con 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC) propuesto a partir de estudios por resonancia paramagnética de electrones (EPR) y transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Este es un modelo de doble cinturón con un registro de hélice LL5/5 antiparalela, aunque con una región (residuos 134-145) que actúa como lazo (*loop*) y protruye del disco, y que ha sido propuesto como un sitio potencial para la activación de LCAT e interacción con membranas fosfolípídicas, como por membranas celulares [83].
- *Belt-buckle model (Figura 1.9 B)* es un modelo de rHDL obtenido para dos diámetros distintos de 8 y 9,6 nm con POPC obtenidos por XL-MS. Este modelo no mostró regiones que sobresalen de la estructura, pero se diferencia de la forma clásica por mostrar un pliegue en la región que comprende los residuos 1-44 [84]. Además, hay que resaltar que, en este modelo, la configuración es distinta entre ambos diámetros de rHDL, siendo de LL5/5 y LL5/2 para los diámetros de 9,6 y 8 nm, respectivamente.
- *Solar-flared model (Figura 1.9 C)* es un modelo de partículas de rHDL de 9,6 nm con POPC y FC formulado a partir de experimentos de intercambio de hidrógeno-deuterio y MS (HDX-MS), con características similares al *looped belt model* [85], aunque con un *loop* entre los residuos 159-180.

- *Flip-helical model* es un modelo de partículas rHDL de 10 nm con POPC obtenido por experimentos de intercambio de hidrógeno y MS (HX-MS). Este modelo fue obtenido con una extensión casi completa de estructura secundaria, a excepción de los residuos 6 y 7. Este presenta rasgos estructurales similares a los descritos previamente, pero con una región entre los residuos 125-158 que fluctúa (*flip*) entre una estructura helicoidal y una menos ordenada [86].

Por otra parte, estudios por MD con un modelo rígido de rHDL (apoA-I 44-243, el principal *scaffold*) como punto de partida mostraron fluctuaciones alrededor de sus moléculas de apoA-I similares a los reportados previamente por técnicas experimentales [87–90]. Los resultados de estas simulaciones a diversos tiempos y con diferentes métodos: 1 (*all atoms*), 4,2 (*all atoms*), 200 (*all atoms*) y 400 ns (*coarse grained*), se caracterizaron por alejarse de la forma plana del modelo de rHDL propuesto por *Segrest et al.*, apoyando de esta forma la idea general de flexibilidad en la estructura de rHDL.



**Figura 1.9: Modelos flexibles de rHDL.** Se representan distintos modelos de doble cinturón para rHDL. A) *Looped belt model*, modelo de 9,6 nm de DOPC. B) *Belt-buckle model*. Modelo de 9,6 nm POPC. C) *Solar flared model*, modelo de 9,6 nm POPC/FC. Figuras adaptadas de *Martin et al.* 2006 [83], *Bhat et al.* 2007 [84] y *Chetty et al.* 2013 [86], respectivamente.

Conociendo que las rHDL presentan regiones fluctuantes en su estructura, previamente descritas, se han propuesto diferentes funciones para estas, tales como las siguientes:

- Actuar como sitios de anclaje que permitan la interacción con membranas biológicas. *Córsico et al.* 2000 [91] observaron que la región que comprende los residuos 87-123 (hélices

involucradas H3-H4) en rHDL se une a membranas fosfolipídicas con el lípido marcado 3-(trifluorometil)-3-(m-[125I]iodofenil)diazirina ( $^{125}\text{I}$ -TID-PC), un lípido foto-inducible.

- Ser un sitio de unión para la LCAT. Esta región comprende las hélices H5 y H6 en rHDL de configuración LL5/5, según el modelo molecular del complejo LCAT-rHDL obtenido por una combinación de técnicas de microscopía de tinción negativa, XL-MS y HDX-MS [92].
- Finalmente, estas fluctuaciones pueden actuar como un potencial mecanismo de perturbación de puentes salinos intermoleculares permitiendo así cambios de registro helicoidal. Esto último se observó en experimentos por MD, donde pequeños cambios en la estructura de partida en rHDL de configuración LL5/5 resulta en diferencias estructurales de alineamiento entre sus moléculas de apoA-I durante el curso de una simulación [87].

Todas estas observaciones demuestran la idea general de flexibilidad del componente proteico de las rHDL, aun así, el componente lipídico también muestra un grado de flexibilidad.

### 3) Modelos muy flexibles:

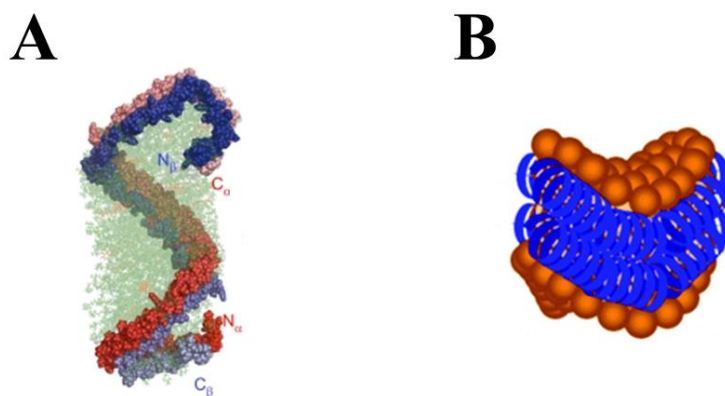
Los modelos descritos previamente apoyan la idea de que las rHDL adquieren forma de discos y que la función de éstas recae en la flexibilidad de apoA-I. Estudios recientes han propuesto que no sólo esta podría mostrar cierto grado de flexibilidad, sino que la estructura membranosa también puede fluctuar entre distintas conformaciones, agregando así versatilidad a las estructuras y, posiblemente, funciones de las rHDL.

- El primer modelo descrito es el denominado *Double Super Helix* o *winding-shaped* (**Figura 1.10 A**) para partículas de rHDL de 9,6 nm con POPC y FC. Este modelo, determinado a partir de resultados de dispersión de neutrones a bajos ángulos (SANS), es presentado como un modelo alternativo al *double belt* [93]. Este se organiza en forma de elipsoide con dos moléculas de apoA-I en un registro de hélice LL5/5 que encapsulan una micela de fosfolípidos. La evaluación de este modelo por MD reportó que durante los tiempos de simulación su estructura helicoidal se

aproxima a la forma discoidal. De esta manera, este resultado respalda la idea general de flexibilidad conformacional que venimos manteniendo y se propone a esta estructura como intermediaria durante la biogénesis de las rHDL [94,95].

- Otro modelo flexible es el conocido como *saddle-shaped*. Este modelo se observó por primera vez por *Miyasaki et al.* 2009 [96] para la forma completa de apoA-I en rHDL de 7,8 nm con POPC. En estos experimentos se evaluó el grado de empaquetamiento de los fosfolípidos en la porción lipídica de las rHDL en dos regiones distintas: grupos polares y cadenas aciladas, con los fosfolípidos fluorescentes rodamina- y pirenil-fosfolípido, respectivamente (**Figura 1.10 B**). Este nuevo modelo fue luego registrado en un estudio por MD. En este estudio, partiendo de un modelo de doble cinturón de rHDL con FC, se evaluó el efecto que tiene la incorporación progresiva de fosfolípidos en su estructura, donde se observó que se alcanza una conversión de la forma de disco hacia la *saddle-shaped* [97]. Finalmente, estas observaciones fueron luego apoyadas por experimentos con péptidos modelos de apoA-I [98].

Resumiendo, la interconversión de las dHDL entre sus múltiples conformaciones con distintos grados de flexibilidad podría ser función del contenido lipídico sobre la bicapa de fosfolípidos que protegen del solvente. En estas conformaciones, las interacciones por puente salino entre las moléculas de apoA-I, como la localización y la cantidad de pares de residuos de prolina podrían jugar un papel importante, permitiendo así cambios de registro de hélice y en consecuencia la función de las dHDL.

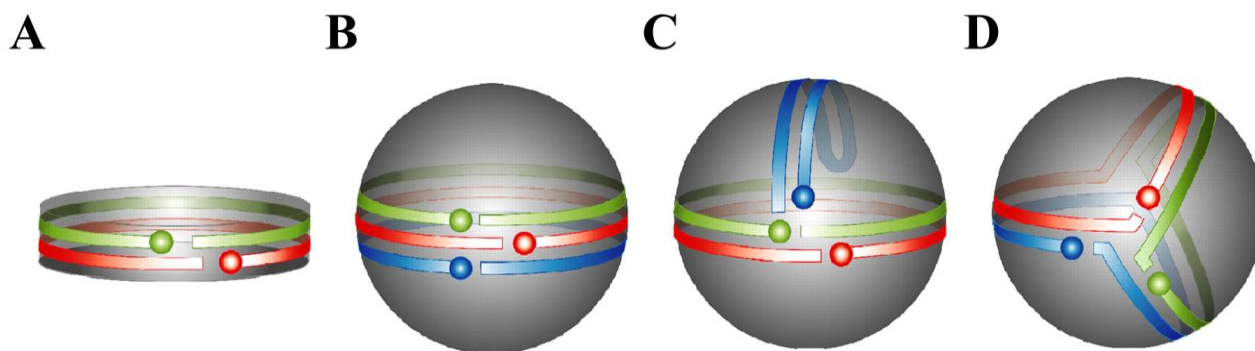


**Figura 1.10: Modelos muy flexibles para rHDL.** A) Modelo de *double-superhelix* (o *winding-shaped*). B) Modelo *saddle-shaped*. Figuras adaptadas de *Wu et al.* 2006 [93] y *Miyasaki et al.* 2009 [96], respectivamente.

#### 1.4.5 ApoA-I en HDL esféricas

La estructura de las sHDL fue inicialmente caracterizada por *Gangani et al.* 2008 [99]. Esta se logró a partir de estudios en sHDL reconstituida *in vitro* a partir de la incubación de rHDL con LCAT y LDL, evaluando esta estructura por XL-MS. Esta partícula fue generada en dos tamaños distintos de 7,6 y 9,2 nm, con dos y tres moléculas de apoA-I, respectivamente. Por esta metodología, se evidenció un patrón de entrecruzamiento químico similar al observado en rHDL generada en las mismas condiciones. A partir de estos resultados *Gangani et al.* propusieron distintos modelos para representar esta estructura siendo el más interesante el modelo de trébol (*trefoil*) para tres moléculas de apoA-I en una configuración cercana a la 5/5/5 en sHDL reconstituidas *in vitro* (**Figura 1.11**). Luego *Wu et al* 2011 [100] obtuvieron resultados equivalentes por SANS, mientras que *Gursky et al.* 2013 [101] terminaron apoyando el modelo *trefoil* a partir de la evaluación de la estructura cristalina del fragmento apoA-I  $\Delta$ 185-243. Estos modelos, igual de equivalentes, evidencian la heterogeneidad de apoA-I de estabilizar diferentes posibles arreglos macromoleculares, donde probablemente la configuración de las moléculas de apoA-I participantes pueda ser un factor relevante.





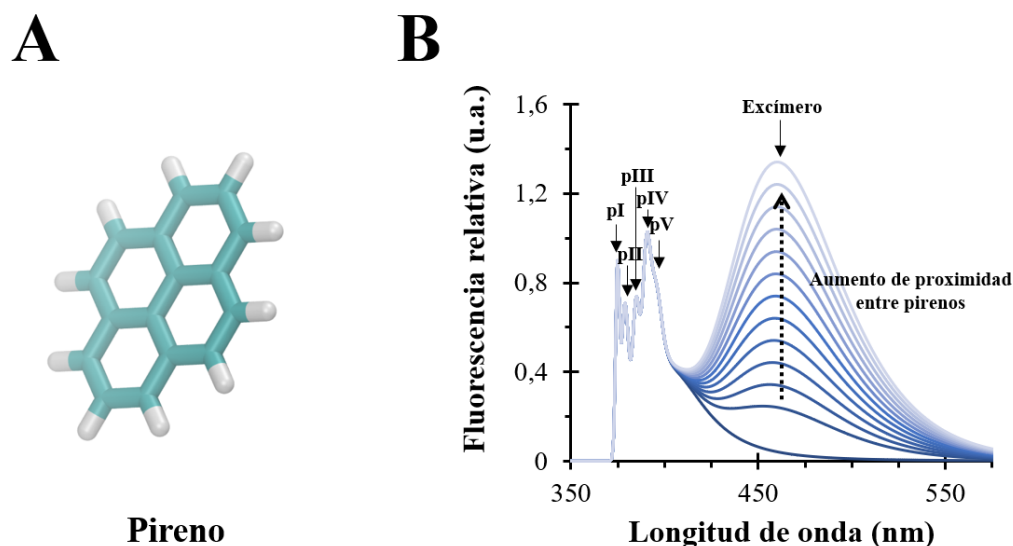
**Figura 1.11: Potenciales disposiciones moleculares de tres moléculas de apoA-I en partículas de HDL esféricas.** A) Modelo clásico de doble cinturón LL5/5 propuesto para rHDL, donde se muestran dos moléculas de apoA-I en rojo y verde, respectivamente. Las esferas de color representan los primeros 44 aminoácidos de cada molécula. B) 1° modelo de sHDL, donde dos moléculas de apoA-I se encuentran dispuestas de manera antiparalela más una tercera en azul, formando un arreglo de triple cinturón con cada molécula en una orientación antiparalela con su vecina. C) 2° modelo de sHDL que muestra dos moléculas de apoA-I dispuestas en una configuración de doble cinturón con una tercera dispuesta en una horquilla. D) 3° modelo de sHDL que enfrenta cada molécula de apoA-I con sus dos vecinos en un arreglo en forma de trébol que evidencia dos regiones: en la primera los extremos N-terminal de cada una se enfrentan, y en la segunda las hélices H5 de cada molécula se encuentran enfrentadas en una orientación cercana a la 5/5/5. Figura adaptada de *Gangani et al.* 2008 [99].

## 1.5 Propiedades espectrales del pireno

El pireno es un hidrocarburo aromático policíclico, de bajo peso molecular y de naturaleza hidrofóbica, constituido por cuatro anillos aromáticos de benceno fusionados (**Figura 1.12 A**). Ha sido utilizado, junto con sus derivados, como sonda fluorescente en múltiples aplicaciones. Aquí se resumen algunos de sus múltiples usos basados en las propiedades intrínsecas de fluorescencia de variantes del pireno:

- Estimación de la concentración molar crítica en sistemas de micelas [102–104].
- Estimación de distancias moleculares por FRET [105,106].
- Sensor de iones bivalentes [107].
- Sensor de moléculas de oxígeno [108–113].
- Sensor del pH en sistemas biológicos [114,115].

Cuando la sonda pireno es disuelta en solución, su espectro de emisión de fluorescencia muestra una estructura fina caracterizada por la presencia de cinco bandas de emisión designadas como I, II, III, IV y V, con picos bien definidos a 375, 379, 385, 390 y 395 nm, respectivamente, según la nomenclatura de *Kalyanasundaram et al.* 1977 [116]. Estas pueden ser más o menos evidentes, unas con respecto a otras, dependiendo de la polaridad del medio donde se encuentran (**Figura 1.12 B**). Además, bajo determinadas condiciones se pueden observar bandas adicionales a longitudes mayores a 400 nm, que pueden ser designadas con números decimales, como por ejemplo la banda de emisión centrada a 420 nm (y que en esta Tesis se denominó banda 6). En el caso de pirenos sustituidos con grupos aniónicos, esta banda cambia su intensidad en función del pH [117–119]. De aquí en más, al conjunto de todas estas bandas las designaremos como emisión de monómero del pireno. Sumada a la emisión del monómero, puede observarse también la emisión de dímeros excitados o excímeros, la cual se caracteriza por una emisión amplia centrada a  $\sim 460$  nm (**Figura 1.12 B**). Esta banda sólo tiene lugar cuando dos moléculas de pirenos se encuentran lo suficientemente cerca uno con respecto al otro ( $< 10$  Å) y con la orientación correcta [120].



**Figura 1.12: Propiedades fluorescentes de la sonda pireno.** A) Representación molecular del pireno molecular. B) Representación del espectro de emisión de fluorescencia, donde se aprecia la estructura fina del monómero (bandas I, II, III, IV y V) y la emisión del excímero del pireno, respectivamente.

Estas bandas de emisión de la estructura fina pertenecen a distintos estados vibro-rotacionales del pireno, cuya intensidad de fluorescencia cambia dependiendo de las condiciones de su entorno, que favorecerá en mayor o menor medida a un estado con respecto al restante. Estas propiedades, junto con la formación de excímeros, pueden ser aprovechadas para poder obtener información relacionada a la estructura y función en proteínas marcadas. Esta sección está dedicada a introducir aspectos fotofísicos de estas propiedades, tanto en solución como unida a proteínas.

### 1.5.1 P-value

Como se mencionó anteriormente, la estructura fina del espectro de emisión del monómero de pireno muestra sensibilidad a cambios de polaridad del solvente [116,121,122], proponiéndose la relación entre las bandas I y III, centradas a 375 nm y 385 nm, respectivamente, como parámetro para monitorear cambios en el microentorno de la sonda. Esta relación se conoce como P-value [120] y se ha utilizado para establecer escalas de polaridad en una amplia gama de solventes [116,123] desde orgánicos a acuosos, siendo el pireno a su vez capaz de distinguir entre solventes próticos y apróticos.

La naturaleza de esta sensibilidad al solvente se ha atribuido a interacciones del tipo (dipolo)-(dipolo-inducido) entre el solvente y modos vibro-rotacionales del pireno, respectivamente [124]. Esta observación surge de estudios de correlación entre constantes de velocidad de transición radiactiva (*Radiactive transition rate constant*, constante proporcional a la intensidad de emisión de fluorescencia del estado vibro-rotacional) con valores de P-value calculados en solventes de distinta polaridad. La evaluación se realizó comparando la transición  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=0}$  (banda I, 375 nm) con la transición  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=v}$ , que corresponde a todas aquellas otras emisiones del pireno (bandas II-V). Esta comparación mostró que la primera de estas transiciones es la que muestra mayor correlación. Dicho de otra manera, la interacción entre el modo vibro-rotacional que corresponde a la banda I con solventes polares favorece la estabilidad de dicho estado, y por lo tanto permite una mayor emisión

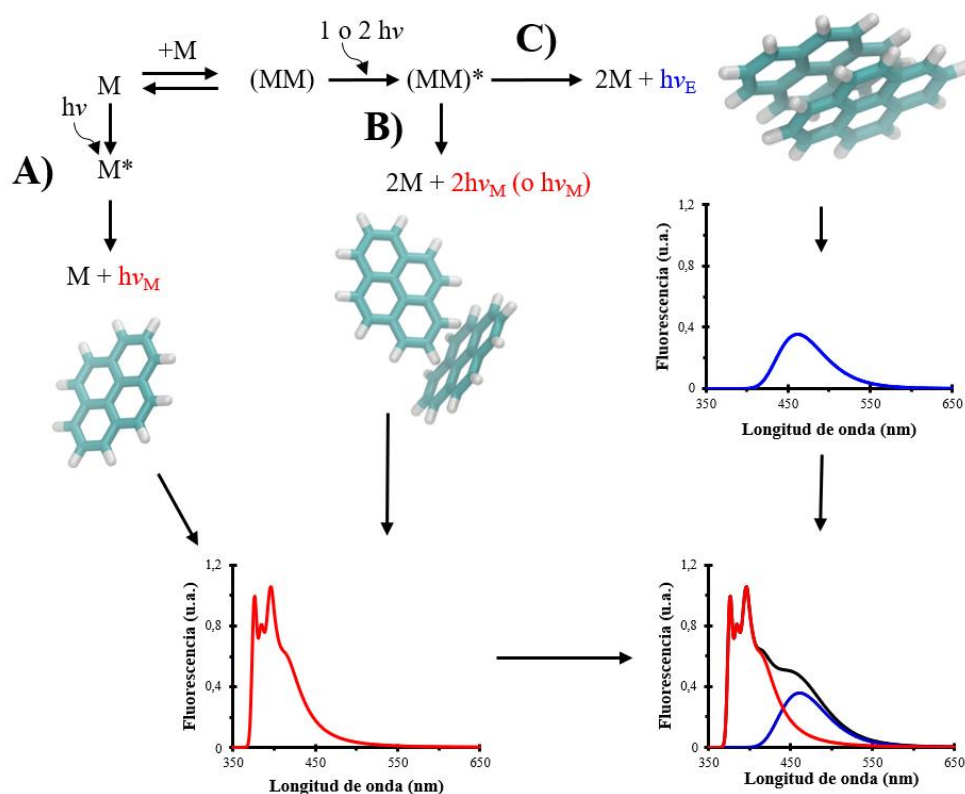
de fluorescencia. Al contrario, cuando este estado se encuentra con solventes de menor polaridad su intensidad de fluorescencia disminuye. Resumiendo, la polarizabilidad del solvente afecta en preferencia al estado vibro-rotacional de la banda I, aunque se desconoce cuál es el efecto real sobre el resto de las bandas, en particular la banda III. Con esta explicación se logra entender el origen de la sensibilidad del P-value al solvente, que a su vez, permite comprender la distinta sensibilidad del pireno frente a solventes próticos y apróticos, presentados por *Dong et al.* 1982 [123].

Esta propiedad de sensibilidad al entorno del espectro del pireno puede ser utilizada para la caracterización estructural en proteínas, registrando tanto el grado de polaridad en distintas posiciones como en respuesta a tratamientos específicos. Esto incluye cambios conformacionales o interacciones con otros componentes biológicos, como membranas, ligandos, drogas u otras proteínas. Cabe destacar que el P-value reporta cambios en el microentorno de la sonda, pero no reporta necesariamente la participación directa de los residuos marcados o sus vecinos en la interacción evidenciada. Así, una proteína marcada con pireno puede interactuar por una de sus caras, y esta interacción podría inducir un cambio conformacional en otra región, donde se ubica la sonda pireno, siendo esta la causa del cambio de señal observable.

### 1.5.2 Excímero de pireno

Otra propiedad del pireno de gran utilidad para la caracterización de biomoléculas, es la capacidad de formación de excímeros (dímeros excitados). Los excímeros son asociados moleculares que sólo existen en el estado electrónico excitado y son detectables en espectros de emisión de fluorescencia. En comparación al espectro de emisión de fluorescencia del monómero, su emisión se caracteriza por estar desplazada hacia el rojo, en una banda no-estructurada y amplia, ya que su emisión abarca un rango aproximado entre 425 y 550 nm, centrada aproximadamente a 460 nm [125]. El excímero se forma si una molécula de pireno en un estado electrónico excitado interacciona con un vecino próximo en un estado electrónico basal. Esta formación se lleva a cabo gracias a que el

pireno posee tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) relativamente muy largos,  $> 200$  ns, permitiendo la formación de excímeros [125]. La condición de proximidad entre moléculas de pireno para que ocurra la formación de excímeros suele ser de  $< 10$  Å, aunque también se han reportado distancias de hasta 20 Å [126,127]. Además, esta condición no es la única que debe satisfacerse para que dicho fenómeno ocurra. Nuevas exigencias surgen de las propiedades de excitación en solventes buenos o clásicos (orgánicos) y en solventes acuosos (pireno anclado a proteínas) [125]. La interacción entre pirenos en el estado fundamental puede facilitar o inhibir la formación de excímeros, dependiendo de la capacidad de estos para acomodarse entre sí, pudiendo existir dos escenarios posibles (**Figura 1.13**). En el primero, dos moléculas de pireno en una configuración precisa (apilados) lleva a la formación de un excímero. En el segundo, estas moléculas en un estado electrónico excitado, llevan a la formación de un complejo no fluorescente que se encuentra desactivado (o *quencheado*) estáticamente. Un ejemplo sencillo de esta situación es el observado en el N-(1-Pirenil)maleimida-Ditiotreitol (NPM-DTT) [125]. Cuando los anillos de succinimida del grupo maleimida, en un dímero de pireno de NPM-DTT, se encuentran intactos no se observa el excímero, pero cuando estos se encuentran abiertos por tratamiento alcalino, se observa el excímero. La explicación a esta situación es que en ambos escenarios las moléculas de pireno se encontraban a una distancia óptima para la formación del excímero, pero no en la orientación adecuada que se logra sólo sin las restricciones estéricas de los anillos de succinimida. De esta manera, en solución acuosa, la posibilidad de dos moléculas de pirenos próximos de formar un excímero o un complejo no fluorescente parece estar determinado, no sólo por la distancia entre las mismas, sino también por sus microentornos y una orientación favorable, idealmente con un pireno apilado sobre otro [125].



**Figura 1.13: Fotofísica del pireno.** Vías de emisión de fluorescencia del pireno. A) Emisión de fluorescencia de una unidad de pireno. B) Emisión cuando dos moléculas de pireno se encuentran próximas, pero con una orientación desfavorable para la formación de excímeros. C) Emisión de excímeros cuando la orientación es óptima. Estos tres fenómenos contribuyen a la emisión total registrada experimentalmente. M: unidad de pireno;  $M^*$  y  $(MM)^*$  estados excitados; y  $h\nu$ ,  $h\nu_M$  y  $h\nu_E$  energía del fotón de excitación, emisión del monómero y del excímero, respectivamente.

## 1.6 Objetivos

### 1.6.1 Objetivos generales

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral consistió en analizar la relevancia de determinadas hélices en apoA-I, en particular H4, H5 y H10 (siguiendo la nomenclatura derivada de la estructura de apoA-I de doble cinturón en rHDL), en sus distintos estados conformacionales: libre en solución, formando oligómeros, en asociación con lípidos y en complejos macromoleculares tales como las rHDL, tanto generadas *in vitro* como *in vivo*. De esta manera, se espera encontrar relaciones entre estas distintas conformaciones y comprender mejor la biogénesis que lleva a la generación de HDL, principales aceptores del colesterol periférico para su catabolismo y eliminación. El fin último de los estudios propuestos es mejorar nuestro entendimiento del rol fisiopatológico de la proteína apoA-I y de los mecanismos moleculares que intervienen en el transporte reverso del colesterol y la enfermedad aterosclerótica.

### 1.6.2 Objetivos específicos

- Generar distintas variantes mutantes de apoA-I en las hélices de interés.
- Purificar y marcar estas proteínas con la sonda fluorescente pireno.
- Evaluar la estabilidad y funcionalidad de estas proteínas marcadas.
- Estudiar la auto-asociación de apoA-I libre de lípidos marcada con pireno en soluciones acuosas con modelos de asociación a través de modelos matemáticos.
- Analizar la participación de las hélices estudiadas en la interacción de apoA-I con membranas biológicas y complejos de HDL generados *in vitro* e *in vivo*.

Esta página se encuentra en blanco



# **Capítulo 2:**

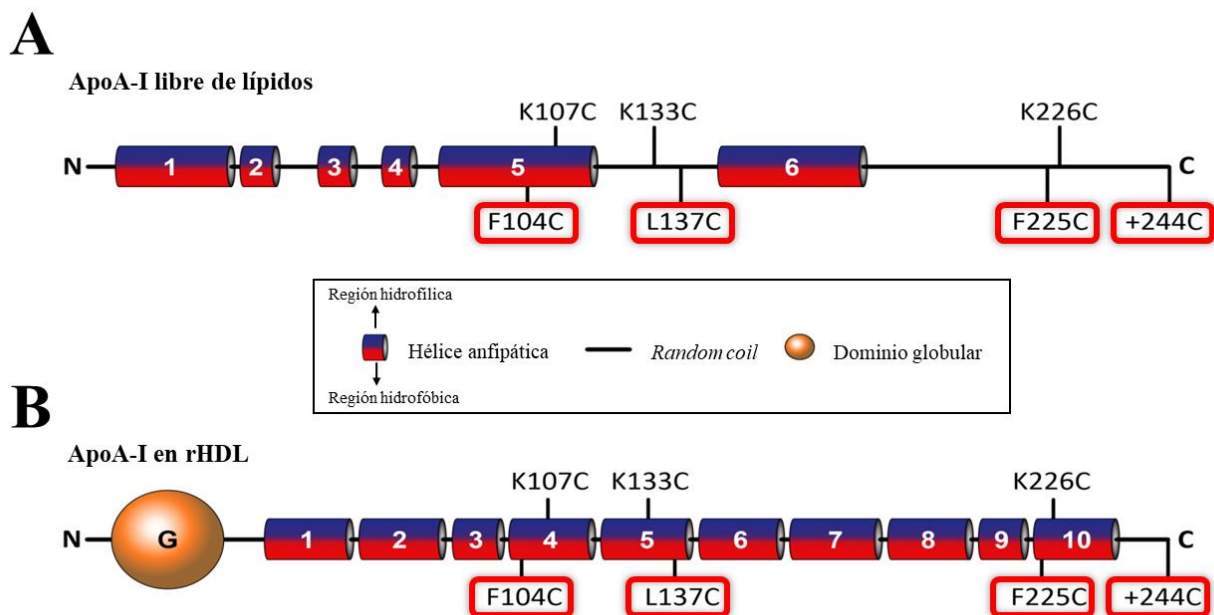
# **Resultados**

Esta página se encuentra en blanco

## 2.1 Construcción de variantes mutantes de apoA-I

### 2.1.1 Objetivos

En el transcurso de la Tesis Doctoral de la Dra. Luz A. Cuellar 2012 [128] se generaron en apoA-I mutantes de sustitución única de residuos de lisinas (Lys, K) por cisteínas (Cys, C): K107C, K133C y K226C, en las caras hidrofílicas de las hélices H4 (residuos 99-120), H5 (residuos 121-142) y H10 (residuos 220-243), según la nomenclatura propuesta por *Segrest et al.* 1974 en rHDL [70,71]. Estas posiciones fueron seleccionadas en base a la cercanía entre estos residuos en modelos de configuraciones LL5/5 y LL5/2. Estos modelos fueron inicialmente propuestos por *Silva et al.* 2005 [81] a partir de resultados de XL-MS. A su vez, estas mutantes permitieron en el laboratorio del Dr. Horacio Garda distinguir estos arreglos en rHDL reconstituidas *in vitro* por dos metodologías: diálisis con colato y microsolubilización directa. Estos resultados fueron publicados por *Cuellar et al.* 2014 [129], donde las posiciones 107 y 133 fueron útiles en distinguir por FRET los arreglos LL5/2 (o LL4/4) y LL5/5, respectivamente. La primera configuración fue observada en rHDL reconstituidas por microsolubilización y la segunda por diálisis con colato. En ambas metodologías la posición 226 actuó como control negativo no registrando proximidad consigo misma en rHDL. En esta Tesis Doctoral se complementaron estas variantes con sus contrapartes en las caras hidrofóbicas: F104C (Phe, F), L137C (Leu, L) y F225C, seleccionadas a partir del diagrama de hélices en las hélices H4, H5 y H10 (**Figura 2.1**). Además, se generó la mutante +244C de única Cys localizada fuera de la secuencia de apoA-I en la posición 244. Esta actuaría como control negativo en algunos de los experimentos realizados. De esta manera, el primer objetivo planteado fue la obtención de estas 4 mutantes para luego purificarlas y utilizarlas en experimentos biofísicos y en células en cultivo.



**Figura 2.1: Posiciones seleccionadas en apoA-I.** A) Modelo de la forma libres de lípidos de apoA-I propuesto por *Melchior et al.* 2017 [40]. B) Modelo de la forma unida a lípidos por *Segrest et al.* 1974 [70,71]. En cada modelo la estructura secundaria  $\alpha$ -hélice se representa en forma de barril con las caras hidrofílica e hidrofóbica en azul y rojo, respectivamente. Además, en la figura se resaltan con un recuadro en rojo las mutantes diseñadas en esta Tesis Doctoral (posiciones 104, 137, 225 y 244).

### 2.1.2 Generación de variantes mutantes

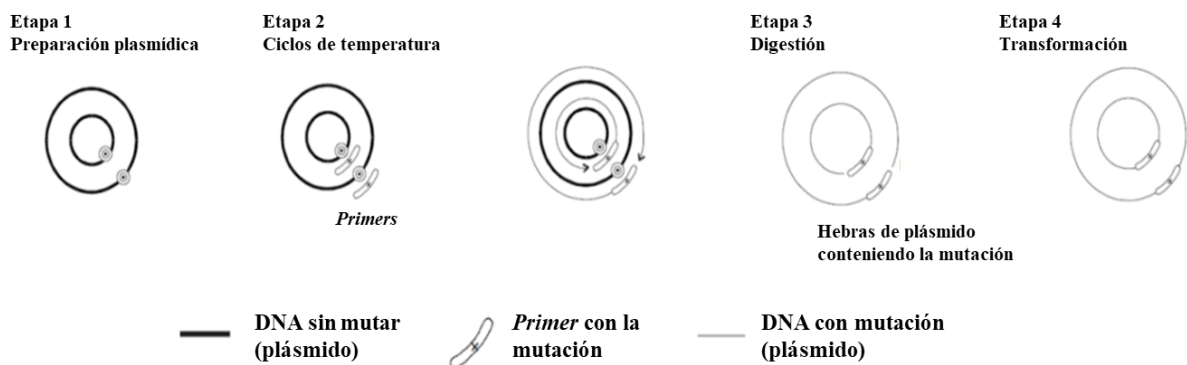
En base a las sustituciones escogidas para generar las mutantes F104C, L137C y F225C se construyeron los *primers* necesarios utilizando el software online Oligo Calc: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. Los oligonucleótidos generados son aquellos presentados en la **Figura 2.2 A**. La secuencia molde fue el DNA codificante (cDNA) de la forma humana de apoA-I con la mutación E2D (que denominaremos apoA-I WT), que permite el clivaje químico en esta posición, insertada en el vector pET30a(+) (ver siguiente sección). Se escogió la metodología en la que se basa el kit *QuikChange™ site-directed mutagenesis* (Stratagene) para generar las sustituciones de pares de bases (**Figura 2.2 B**), una estrategia sencilla que se basa en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De esta manera, se lograron introducir mutaciones de una y tres bases en la secuencia de cDNA de apoA-I WT. Posteriormente, la mutante

+244C fue sintetizada por la empresa Biomatik (EEUU), cuya región codificante fue modificada para optimizar el uso de codones en *Escherichia coli* (*E. coli*) y luego clonada en el vector pET30a(+).

**A**

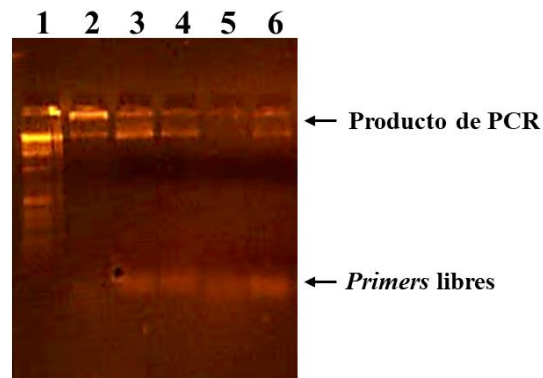
Mutante	Primers directo
F104C	5' CC TAC CTG GAC GAC <u>TGC</u> CAG AAG AAG TGG CA 3'
L137C	5' G AAG CTG CAC GAG <u>TGT</u> CAA GAG AAG CTG A 3'
F225C	5' CTG GAG AGC <u>TGC</u> AAG GTC AGC 3'

**B**



**Figura 2.2: Obtención de variantes mutantes de Cys en apoA-I.** La figura muestra la metodología utilizada en esta Tesis Doctoral en la generación de variantes mutantes. A) Secuencia de los *primers* utilizados, donde los codones que codifican los aminoácidos a Cys se encuentran resaltados. B) Metodología utilizada, *QuikChange site-directed mutagenesis*. Esta se divide en cuatro etapas: 1) Obtención y preparación del DNA plasmídico por miniprep; 2) PCR con los *primers* diseñados; 3) digestión con DpnI para eliminar el DNA molde; y 4) transformación en cepas de clonado para posterior extracción de DNA plasmídico y secuenciación.

En la **Figura 2.3**, y a modo de ejemplo, se observan los productos de PCR obtenidos para las mutantes F104C, L137C y F225C. Luego estas se trataron con DpnI, y el producto de digestión se introdujo (transformación por shock térmico) en la cepa de clonado *E. coli* JM109, previamente permeabilizadas por la técnica de generación de células competentes. En un estriado en placa con LB-Agar (Luria Bertani-Agar), se seleccionaron aquellas colonias con resistencia a Kanamicina (Kan). De las colonias resistentes, se obtuvo el DNA plasmídico por miniprep y se enviaron a un servicio de secuenciación (Macrogen, Korea del Sur) para corroborar la introducción correcta de las mutaciones buscadas.



**Figura 2.3: PCR de solapamiento.** Gel de agarosa al 4 %, donde se muestra el producto de PCR y los *primers* libre sin reaccionar en la obtención de variantes mutantes de apoA-I luego de la reacción de PCR. Calle 1: marcador de peso molecular; calle 2: apoA-I WT; calle 3: F104C; calle 4: L137C; calle 5: no aplicable; y calle 6: F225C.

### 2.1.3 Conclusión

En conclusión, logramos obtener mutantes puntuales de Cys en apoA-I que complementan las ya disponibles en el laboratorio. Estas mutantes serán utilizadas en experimentos biofísicos, donde se buscará caracterizar la relevancia de estas posiciones.

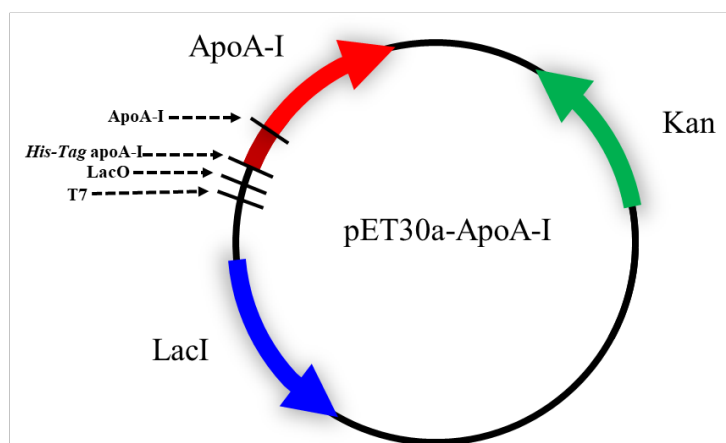
## 2.2 Expresión, purificación y marcación de variantes mutantes de apoA-I

### 2.2.1 Objetivos

A partir de las mutantes previamente diseñadas en el laboratorio (mutantes K107C, K133C y K226C), y las complementarias generadas en esta Tesis (mutantes F104C, L137C, F225C y +244C), el siguiente objetivo fue la obtención de estas proteínas con un grado de pureza y rendimiento requerido para los experimentos que se describen en esta Tesis. Una vez obtenidas, las variantes de apoA-I deben ser marcadas eficientemente con la sonda fluorescente N-maleimida pireno.

### 2.2.2 Obtención de cepas de expresión

Una vez confirmada la secuencia de todas las mutantes, los plásmidos que las contienen se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3), que tiene incorporado en su genoma el gen de la T7-RNA *pol* bajo el promotor inducible del Operón Lac (**Figura 2.4**). Luego se seleccionaron colonias aisladas y uniformes resistentes a Kan y se evaluó su capacidad de expresión con un ensayo en microescala. Todas las colonias seleccionadas mostraron un rendimiento de expresión equiparable, por lo que se eligió una para la expresión de cada mutante y se guardaron en *stocks* de glicerol a -70°C.

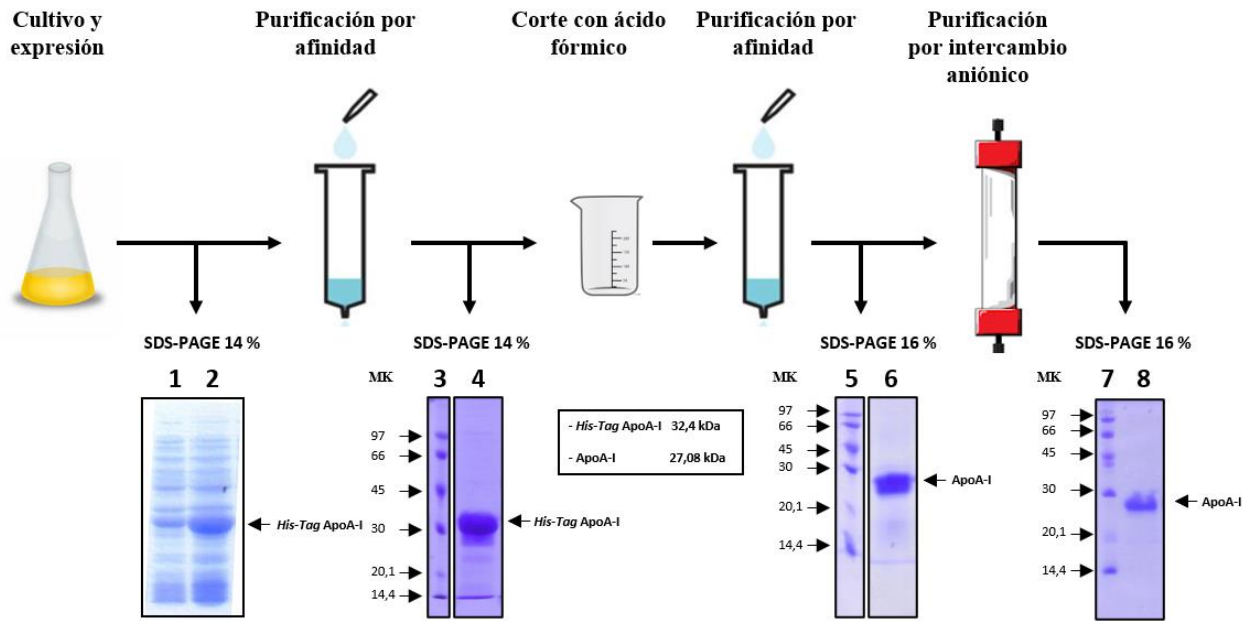


**Figura 2.4: pET30a-ApoA-I.** Representación de los elementos más importantes que posee el vector de expresión pET30 con el inserto de apoA-I.

### 2.2.3 Expresión y purificación

La expresión y purificación de proteínas recombinantes se llevó a cabo como está descrito en materiales y métodos (ver **Sección 4.1.3**). El proceso completo se encuentra resumido en la **Figura 2.5**. Brevemente, luego de un primer paso de extracción y clarificación, la purificación se lleva a cabo en tres etapas de cromatografía, las dos primeras por afinidad a metales pesados (IMAC) y la última por intercambio aniónico.





**Figura 2.5: Protocolo de purificación de apoA-I.** Protocolo utilizado para purificar variantes mutantes de Cys de apoA-I. Orden de calles en gels SDS-PAGE: calle 1: muestra de cultivo sin inducir con IPTG; calle 2: muestra de cultivo con inducción con IPTG; calle 4: elución con 100 mM Imidazol; calle 6: elución con 5 mM Imidazol; calle 8: después de la purificación por intercambio iónico; y calles: 3, 5 y 7: marcador de peso molecular (MK) en kDa.

Inicialmente, bacterias BL21 (DE3) en *stock* glicerol a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , conteniendo el plásmido pET30a-ApoA-I, fueron cultivadas en medio LB con Kan e inducidas con Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Luego estas se centrifugaron y se obtuvo un pellet resultante. Posteriormente, el pellet fue disuelto y sonificado en presencia de cloruro de guanidinio (GdHCl) y  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) (en nuestro caso con mutantes de Cys). Finalmente, se eliminaron los restos celulares por ultracentrifugación y se obtuvo un sobrenadante clarificado.

El sobrenadante fue cargado en una columna de IMAC. Se eluyeron las impurezas y nuestra proteína de interés con 35 mM y 100 mM de imidazol en un buffer de equilibrio (EQB) suplementado con GdHCl y BME a pH 7,4 (25 mM  $\text{NaHPO}_4$ , 500 mM NaCl, 3M GdHCl y 10 mM BME), respectivamente. Luego estas fracciones fueron sometidas a un tratamiento en condiciones ácidas y de temperatura, incubando 5 hs a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  al 45 % de ácido fórmico en presencia de 3 M GdHCl, para cortar en forma química el enlace peptídico  $\text{Asp}^2\text{-Pro}^3$ . De esta manera, se

separó el *His-Tag* N-terminal de la forma madura de apoA-I y se obtuvieron proteínas recombinantes que carecen de sus dos primeros residuos, lo cual no afecta su estructura ni su función según *Prieto et al.* 2012 [130]. La **Figura 2.6** muestra este sitio propuesto por *Ryan et al.* 2003 [131] para la forma apoA-I WT. Cabe destacar que este método de proteólisis con ácido fórmico no fomenta modificaciones sobre la proteína purificada, particularmente formilaciones según *Ryan et al.* 2003.

Sitio lábil a la hidrólisis ácida



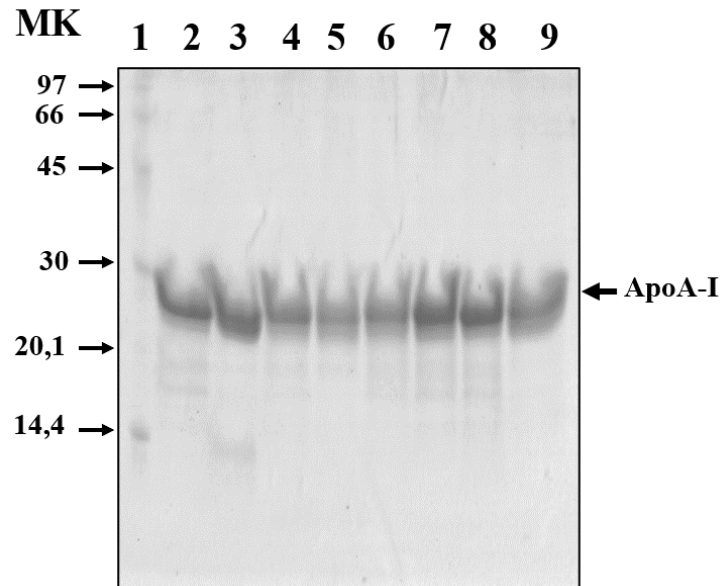
DDPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLRE  
 QLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLR  
 AELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRQLAARLEALKENGG  
 ARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

**Figura 2.6: Secuencia de apoA-I WT.** En azul se representa la secuencia completa de apoA-I WT, y en rojo el enlace peptídico sensible a la hidrólisis química en condiciones ácidas.

La separación del *His-Tag* cortado y nuestra proteína de interés se llevaron a cabo por un segundo paso de separación por IMAC. En esta etapa, nuestra proteína de interés eluye principalmente como fracción débilmente retenida por la matriz con 5 mM Imidazol. El *His-Tag* cortado y la proteína sin cortar se eluyen con 100 mM Imidazol. De esta manera, logramos obtener nuestra proteína sin el *His-Tag*.

Finalmente, se agregó un paso de purificación por intercambio iónico que nos permitió mejorar la pureza y evitar proteínas contaminantes con Cys que generen señales aberrantes de formación de excímeros (ver **Sección 2.2.4**). Brevemente, las proteínas fueron dializadas exhaustivamente para eliminar las sales del medio, y disueltas en buffer Tris 30 mM + Urea 4 M pH 8. Luego estas se inyectaron en una columna de separación por intercambio aniónico (MonoQ). La modalidad de separación fue por gradiente con un buffer de siembra A de Tris 30 mM + Urea 4 M pH 8 y un buffer de elución B conteniendo 1 M NaCl, con un gradiente entre 10 y 35 %. Del perfil de elución obtenido se seleccionaron aquellas fracciones que conservaron una gran

cantidad de proteína y una alta pureza. Estas se concentraron y se almacenaron en GdHCl a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización. La **Figura 2.7** muestra un SDS-PAGE de todas nuestras proteínas purificadas y marcadas con la sonda fluorescente pireno.



**Figura 2.7: SDS-PAGE 16 % de variantes de apoA-I-Pireno purificadas.** Se representa en un gel SDS-PAGE, teñido con *coomassie blue*, el grado de pureza de variantes mutantes de apoA-I purificadas marcadas con pireno. Calle 1: marcador de peso molecular (MK) en kDa; calle 2: apoA-I WT; calle 3: K107C; calle 4: K133C; calle 5: K226C; calle 6: F104C; calle 7: L137C; calle 8: F225C; y calle 9: +244C.

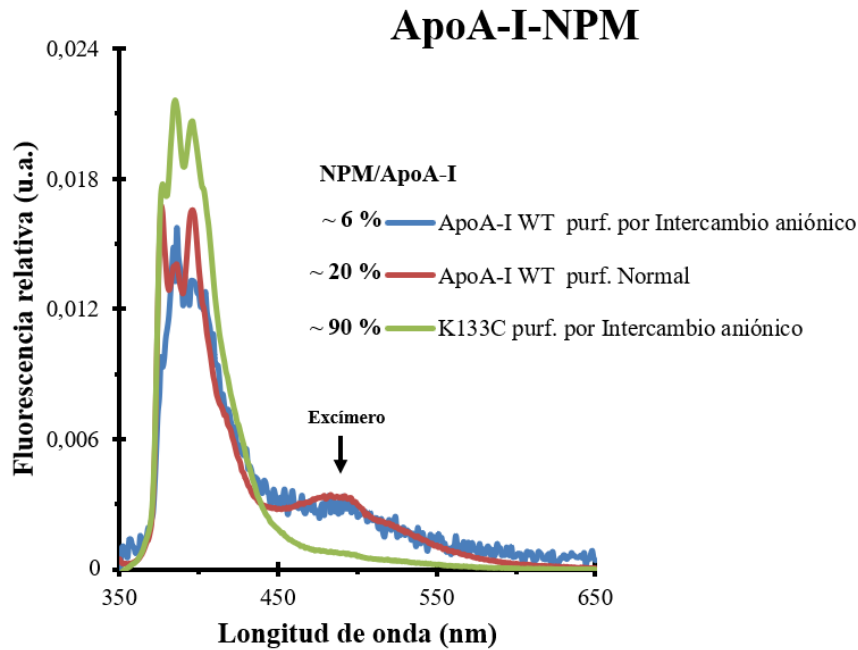
En conclusión, se lograron obtener nuestras proteínas de interés purificadas. Se obtuvo un grado de pureza de  $>96\%$  con un rendimiento de 7,5-10 mg/L de cultivo, no observándose citotoxicidad por lipopolisacárido en cultivos celulares. El rendimiento y la pureza entre mutantes de Cys y apoA-I WT fueron similares, a excepción de K226C, donde fue evidente la formación de dímeros de Cys irreversibles por oxidación durante la purificación y que no se reducen por tratamiento con BME. En este caso particular, la separación de este dímero fue realizada por exclusión molecular (Superdex 75), después de haber realizado la marcación con la sonda fluorescente pireno, obteniéndose un rendimiento de purificación inferior al resto de las variantes mutantes de apoA-I.

### 2.2.4 Marcación de proteínas

Mutantes de Cys de apoA-I fueron marcadas con la sonda fluorescente N-(1-Pirenil)maleimida (NPM), según se describe en materiales y métodos (**Sección 4.1.5**). Brevemente, proteínas disueltas en buffer PBSDG, 25 mM NaHPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 7 mM EDTA, 30 % Dimetilsulfóxido (DMSO) y 3 M GdHCl a pH 6,5, fueron incubadas durante 1 hs con un exceso de Tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato (TECP) (1:10, apoA-I:TECP). Luego estas se incubaron a 25 °C con un exceso de sonda NPM (1:5, apoA-I:NPM), añadiendo ésta en tres agregados de 1 hs cada una (3 hs de incubación total). Finalmente, se detuvo la reacción agregando un exceso de Glutación (1:10, NPM:Glutación). Para estimar la reacción inespecífica en las condiciones planteadas se incluyó apoA-I WT como control.

La separación del exceso de sonda libre de proteína marcada se llevó a cabo por exclusión molecular por columna G-25 en forma isocrática en buffer fosfato-salino (PBS, 25 mM NaHPO<sub>4</sub> y 150 mM NaCl) suplementado con 4 M Urea a pH 6,5. Se seleccionaron aquellas fracciones que mostraron señal de absorbancia en proteína (A<sub>280 nm</sub>) y en sonda NPM (A<sub>343 nm</sub>). Estas se concentraron y se almacenaron en 3 M GdHCl a -20 °C hasta su utilización en experimentos posteriores. Previo a congelarlas, el grado de marcación se calculó como cociente entre la concentración de NPM y de apoA-I. La primera se calculó por absorbancia a 343 nm y la segunda por el método del ácido bicinonínico (BCA). De esta manera, se obtuvieron grados de marcación, en promedio por encima del 70 %, que nos permitió trabajar en experimentos biofísicos planificados.

Para corroborar señales aberrantes de formación de excímeros se adquirieron espectros de emisión de fluorescencia excitando a 345 nm en condiciones desnaturalizantes (**Figura 2.8**). De esta manera, se logra obtener espectros puros de señal de pireno, en ausencia de estructura nativa, que validará los cambios espectrales en sus distintos agregados macromoleculares con mutantes de Cys de apoA-I marcadas con pireno.



**Figura 2.8: Fluorescencia de pireno en muestras de apoA-I.** Se muestran espectros de emisión de fluorescencia de apoA-I WT y K133C en 3 M GdHCl que fueron sometidas a un tratamiento para marcarlas con la sonda NPM. Para comparar los espectros estos fueron relativizados por su fluorescencia total. Se evaluaron dos condiciones: 1) protocolo normal, que no incluye la purificación por intercambio aniónico; y 2) paso adicional de purificación por intercambio aniónico. En la figura también se muestra la reducción del grado de marcación inespecífico de ~ 20 a ~ 6 %, con apoA-I WT, y 90 % con K133C, además de una reducción de la señal aberrante de formación de excímero alrededor de 460 nm con estas muestras de proteínas marcadas.

### 2.2.5 Conclusión

En conclusión, logramos obtener las mutantes de interés marcadas con la sonda pireno con un grado de pureza deseable para los experimentos biofísicos que se desarrollaran a continuación. Estas proteínas están libres de señales aberrantes de formación de excímero que permitirán asociar los cambios espectrales de la fluorescencia del pireno a procesos de asociación o cambios del microentorno alrededor de las posiciones seleccionadas.

## 2.3 Controles estructurales de variantes mutantes de apoA-I

### 2.3.1 Objetivos

Una vez purificadas y marcadas nuestras proteínas de interés, el siguiente paso es la caracterización de éstas para conocer si mantienen la forma estructural y funcional de la forma apoA-I WT. Esta caracterización es llevada a cabo por: 1) un método *in silico*, que evalúa la sensibilidad a la mutación en las posiciones seleccionadas; 2) por fluorescencia intrínseca de residuos de triptófano (Trp, W), que proporciona información estructural en relación al grado de exposición de estos residuos al solvente; 3) por un método *in silico*, sobre modelos de rHDL para evaluar la sensibilidad a la mutación en las posiciones seleccionadas; y 4) por evaluación de la capacidad de formar rHDL *in vitro*, por dos metodologías distintas, estas últimas consideradas como control funcional. De esta manera, una vez evaluada la funcionalidad de nuestras variantes mutantes podemos asignar una correcta interpretación a los resultados que luego obtendremos.

### 2.3.2 Estimación de la estabilidad de plegamiento *in silico* de apoA-I libre lípidos

Una vez generadas las variantes mutantes de apoA-I, quisimos conocer si estas eran estables en solución. Para resolver este problema, en una primera aproximación, llevamos a cabo una evaluación *in silico* de la estabilidad de plegamiento de estas variantes. Para realizar esto, se utilizó el software FoldX [132] ([http:// foldx.embl.de/](http://foldx.embl.de/)) y el modelo de apoA-I monomérica propuesto por Melchior *et al.* 2017 [40] (<https://homepages.uc.edu/~davidswm/structures.html>). Esta metodología es de fácil uso, disponible online y tiene una confianza de 0,81 de correlación sobre un conjunto de 1000 proteínas distintas [133]. La evaluación se llevó a cabo en las posiciones que corresponden a las seleccionadas para el desarrollo de esta Tesis (posiciones 104, 107, 133, 137, 225 y 226), a excepción de 244, que no existe en la forma completa de apoA-I. De esta manera, se espera conocer

si las posiciones seleccionadas, como sitios de unión a una sonda fluorescente, son sensibles a la mutación y a la unión de la sonda fluorescente pireno.

La estrategia *in silico* consistió de los siguientes pasos: 1) minimizar la estructura proporcionada por *Melchior et al.* 2017 [40] en formato pdb; 2) generar las variantes de sustitución en las posiciones de esta Tesis con los 20 aminoácidos naturales a partir de librerías de rotámeros; y 3) estimar el efecto que tienen estas sustituciones sobre la estabilidad de plegamiento como la diferencia en energía libre de *Gibbs* entre la variante mutante y la apoA-I WT ( $\Delta\Delta G^{\circ}_{\text{Mut-WT}}$ ). Luego de haber calculado estas diferencias de energía, nos enfocamos, inicialmente, en el efecto que tienen las 20 sustituciones naturales sobre las posiciones seleccionadas (posiciones 104, 107, 133, 137, 225 y 226), en particular la sustitución por Prolina (Pro, P). Consideramos esta última sustitución como un control negativo del impacto sobre el plegamiento, en especial en aquellas regiones con estructura secundaria definida como lo son las  $\alpha$ -hélices (residuos de apoA-I en  $\alpha$ -hélices: 104 y 107; y residuos en *random coil*: 133, 137, 225 y 226). De las sustituciones evaluadas, por un lado, nos concentramos en el efecto que tiene la sustitución por Cys, ya que esta es la utilizada en esta Tesis; y por otra parte, revisamos el efecto que tienen las sustituciones por tirosina (Try, Y), Trp y fenilalanina (Phe, F), aminoácidos que consideramos que serían equivalentes en términos de aromaticidad a la unión covalente de la sonda aromática pireno. La **Tabla 2.1** muestra estos resultados para las sustituciones en las posiciones 104, 107, 133, 137, 225 y 226 por los 20 aminoácidos naturales. De esta forma, se espera evaluar la importancia que tienen estas posiciones en la estabilidad global de la proteína, la estabilidad de las mutantes de Cys generadas, y el efecto que podrían acarrear la marcación con la sonda pireno.

La **Tabla 2.1** muestra que, en general, la posición 104 fue la más vulnerable a la sustitución, clasificada como desestabilizante y altamente desestabilizante para la mayoría de las sustituciones realizadas, siguiendo la escala propuesta por *Studer et al.* 2014 [134]. Cabe aclarar que las sustituciones con el mismo aminoácido de origen pueden generar valores en  $\Delta\Delta G^{\circ}_{\text{Mut-WT}}$  diferentes a

cero, por ejemplo, la sustitución “K107→K” proporciona un valor  $-0,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Esta discrepancia se debe a que en ambas estructuras (la de origen y la generada por sustitución con el mismo aminoácido) se encuentran con diferentes orientaciones en sus rotámeros en el aminoácido a evaluar, y por lo tanto tienen distintos valores de energía. Con respecto a la sustitución por Cys, las posiciones más comprometidas fueron 104, 107 y 226 siendo la primera altamente desestabilizante y las últimas dos ligeramente desestabilizantes. En las posiciones 133, 137 y 225 el efecto fue neutro (la sustitución no tiene efecto en la estabilidad de plegamiento), a pesar de que en las primeras dos posiciones (133 y 137) la sustitución por Pro no afectó la estabilidad de plegamiento. Por otro lado, las sustituciones por los aminoácidos aromáticos Tyr, Trp y Phe muestran que únicamente la posición 104 es altamente desestabilizante. Cabe recalcar que se esperaba que la estabilidad se restableciera por la incorporación de un aminoácido aromático (Trp o Phe). Posiblemente, esto puede explicarse por la relevancia de esta posición en la participación de un *cluster* aromático entre los residuos F33, F104 y W108, que mantiene la estabilidad de la conformación nativa de apoA-I [62]. Para finalizar, las posiciones 107, 133 y 137 fueron neutrales, mientras que las posiciones 225 y 226 fueron en general estabilizantes. En conclusión, todas las posiciones evaluadas son poco sensibles a la sustitución aminoacídica, a excepción de la posición 104.



**Tabla 2.1: Sensibilidad a la sustitución en la forma libre de lípidos de apoA-I**

		Arg	Lys	His	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Thr	Met	Cys	Pro	Gly	Ala	Leu	Val	Ile	Tyr	Trp	Phe
Posición	Residuo	R	K	H	D	E	N	Q	S	T	M	C	P	G	A	L	V	I	Y	W	F
104	F	5,6	4,5	3,7	5,4	4,3	4,5	3,3	4,4	3,7	1	4,1	3,6	5	3,7	1,6	2,7	2,9	1,1	5,7	0
107	K	-0,3	-0,1	0,4	1	0,5	0,3	0	1,1	1	-0,2	0,8	2,2	0,9	0,3	-0,4	0,5	-0,2	0,1	0,2	-0,3
133 <sup>a</sup>	K	0,6	0	0,4	1,3	-0,1	0,1	0,5	1,5	1,6	-2,9	0	-0,6	0,9	0,4	-2,1	0,7	0,3	0,1	-0,4	-0,2
137 <sup>a</sup>	L	0,2	0	0,3	0	0,3	-0,1	-0,1	0,2	0,5	-0,1	0,4	-0,6	0,2	-0,1	0	0,6	0,4	0	0	-0,1
225 <sup>a</sup>	F	0,7	0,3	0,4	2	1,6	0,3	0,7	1,2	1,3	0	0,4	1,1	1,3	0,8	0,3	0,6	0,8	0	-0,6	0
226 <sup>a</sup>	K	0,1	0	1,3	1,9	1,9	0,5	0,5	2,3	1,5	-1,1	0,7	4,8	2,7	1	-0,6	-0,1	0,4	-1,0	-0,2	-1,6

La sensibilidad a la sustitución fue calculada como la diferencia en energía libre en kcal·mol<sup>-1</sup> entre la forma mutante y apoA-I WT ( $\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT}$ ). Para el análisis se utilizó el modelo propuesto por Melchior *et al.* 2017 [40]. La minimización, reparación y estimación del  $\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT}$  se realizó con el software FoldX. La estabilidad es reportada como el promedio para 5 repeticiones con desviaciones estándar menores a 0,01. Se seleccionaron las posiciones de estas Tesis Doctoral y los aminoácidos a sustituir de interés son resaltados en amarillo: Cys (C), Tyr (Y), Trp (W) y Phe (F). Al mismo tiempo, los 20 aminoácidos a sustituir son resaltados con color dependiendo de la naturaleza polar de estos: con carga positiva (rojo), con carga negativa (azul), polares (marrón claro), no polares (verde) y aromáticos (violeta). (\*) Residuos que no forman parte de estructura  $\alpha$ -hélice. Para conocer el efecto de la sustitución se utiliza la escala de color Rojo-Blanco-Azul para los valores de  $\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT}$  propuesta por Studer *et al.* 2014 [134]:

Highly stabilizing,	$\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < -1,84,$	Azul
Stabilizing,	$-1,84 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < -0,92,$	Azul
Slightly stabilizing,	$-0,92 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < -0,46,$	Azul
Neutral,	$-0,46 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < +0,46,$	Blanco
Slightly destabilizing,	$+0,46 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < +0,92,$	Rojo
Destabilizing,	$+0,92 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < +1,84,$	Rojo
Highly destabilizing,	$\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} > +1,84,$	Rojo

En resumen, esta primera caracterización *in silico* fue útil para estimar la estabilidad de plegamiento de variantes mutantes generadas para este trabajo de Tesis Doctoral. En estos estudios la posición 104 fue la más comprometida tanto para la mutación F104C como para sus equivalentes marcadas con la sonda fluorescente pireno (mutantes F104Y y F104W). Las posiciones restantes, 107, 133, 137, 225 y 226, no mostraron cambios de energías en  $\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT}$  significativos luego de las sustituciones realizadas, indicando que estas posiciones en general no son sensibles a la sustitución. Esto concuerda con la localización de estos residuos en la estructura secundaria de apoA-I, donde en las posiciones 133, 137, 225 y 226 se asignó una estructura *ramdon coil*, a excepción de 107 que se encuentra formando parte de una  $\alpha$ -hélice (**Figura 2.1**).

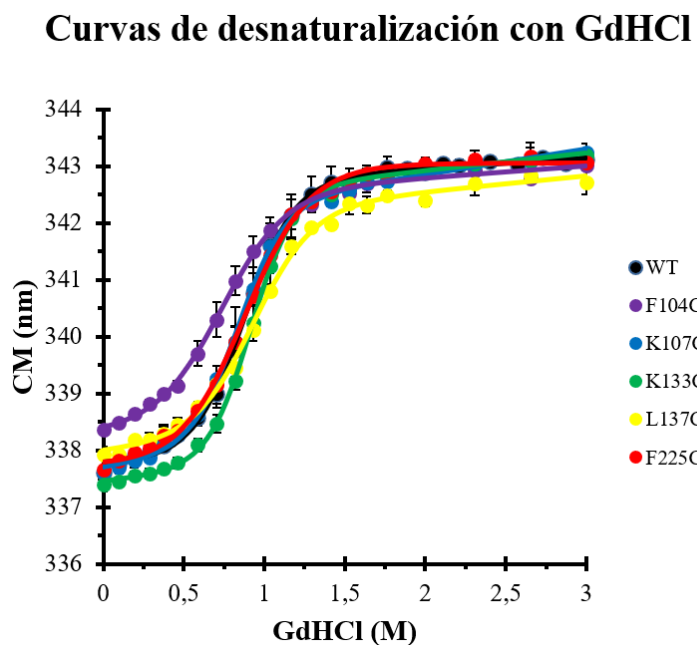
### 2.3.3 Estabilidad proteica en solución

En la sección anterior evaluamos por un método *in silico* el efecto que tienen las sustituciones seleccionadas en esta Tesis sobre la estabilidad de plegamiento de apoA-I. Para comparar aquellos resultados, en esta sección evaluamos la estabilidad de plegamiento *in vitro* por una técnica de fluorescencia. La fluorescencia intrínseca de residuos de Trp en proteínas es una herramienta no invasiva en la caracterización estructural de proteínas en solución. Esta metodología se sustenta en la sensibilidad al entorno del Trp. Es decir, cambios en su espectro de emisión de fluorescencia refleja cambios de entorno que pueden interpretarse como cambios conformacionales. Con respecto a apoA-I, esta posee cuatro residuos de Trp en las posiciones 8, 50, 72 y 108. Esta propiedad se evaluó con el método de titulación con el desnaturizante GdHCl. Se utilizaron las variantes no marcadas F104C, K107C, K133C, L137C y F225C, a excepción de las variantes K226C y +244C que no se encontraban disponibles durante los experimentos. De esta manera, se espera determinar cuáles de las variantes generadas en esta Tesis son apropiadas para realizar experimentos biofísicos.

La concentración de proteína para realizar los experimentos fue de 0,1 mg/ml (3,5  $\mu$ M) en buffer PBS pH 7,4 a 25 °C y la titulación se realizó agregando volúmenes crecientes de solución *stock* de 6 M GdHCl hasta una concentración final de 3 M GdHCl. Sobre cada muestra, se adquirieron espectros de emisión de fluorescencia del Trp por excitación a 295 nm y recogiendo la emisión entre 310 y 560 nm. Luego los cambios espectrales del Trp fueron evaluados por la localización de su centro de masa (CM) como integral entre 310 y 370 nm. Se escogió este rango de integración con el objetivo de contrastar estos datos con los obtenidos con proteínas marcadas con pireno, donde la banda de emisión del Trp y el pireno se superponen. La **Figura 2.9** muestra estas titulaciones obtenidas, donde se puede observar un equilibrio entre las dos especies, *Native-Unfolded* (N-U). La **Tabla 2.2** resume los parámetros termodinámicos calculados luego del ajuste de nuestros datos un modelo N-U. En esta tabla se muestran la longitud de onda de máxima emisión (WMF), la concentración de GdHCl necesaria para alcanzar el 50 % de proteína desnaturizada ( $D_{1/2}$ ), la

energía libre de desnaturalización en condiciones estándar ( $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ , 25 °C y 1 atm, buffer PBS a pH 7,4) y la cooperatividad del proceso de desnaturalización (m).

Comparando los parámetros calculados entre las variantes mutantes y apoA-I WT, se observó que la variante F104C fue la que presentó los valores más bajos en  $D_{1/2}$  y  $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$  de 0,76  $M_{GdHCl}$  y 1,9  $kcal \cdot mol^{-1}$ , respectivamente. Además, esta variante muestra un incremento de aproximadamente de 2 nm en su WMF en ausencia de GdHCl. Estos resultados indican que, salvo con la variante F104C, el resto mostraron un comportamiento equivalente a la apoA-I WT, siendo F104C termodinámicamente la menos estable.



**Figura 2.9: Curvas de desnaturalización con GdHCl.** Código de color: apoA-I WT (negro), F104C (violeta), K107C (azul), K133C (verde), L137C (amarillo) y F225C (rojo).

**Tabla 2.2: Parámetros termodinámicos en variantes mutantes de apoA-I**

Mutante	WMF/nm	$D_{1/2}/M_{GdHCl}$	$\Delta G_{H20}^{\circ}/kcal \cdot mol^{-1}$	$m/kcal \cdot mol^{-1} \cdot M_{GdHCl}^{-1}$
WT	336,93 ± 0,04	0,89 ± 0,03	3,1 ± 0,2	3,5 ± 0,3
F104C	338,8 ± 0,1	0,76 ± 0,03	1,9 ± 0,1	2,56 ± 0,03
K107C	336,9 ± 0,1	0,84 ± 0,03	2,4 ± 0,1	2,8 ± 0,2
K133C	336,4 ± 0,2	0,90 ± 0,02	3,3 ± 0,1	3,7 ± 0,2
L137C	337,7 ± 0,4	0,930 ± 0,003	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,2
F225C	337,2 ± 0,1	0,84 ± 0,05	2,6 ± 0,2	3,1 ± 0,1

Los datos se representan como el promedio ± error estándar por triplicado, a excepción de L137C que fue por duplicado. WMF, longitud de onda máxima de fluorescencia.  $D_{1/2}$ , concentración de GdHCl necesaria para alcanzar el 50 % de proteína desnaturalizada.  $\Delta G_{H20}^{\circ}$ , estabilidad termodinámica en buffer PBS a pH 7,4. m, cooperatividad del proceso de desnaturalización, relacionada con la forma sigmoide de la curva. En el análisis se obvió la mutante K226C, ya que esta variante forma dímeros irreversibles durante la purificación y por lo tanto el análisis no es aplicable.

Para determinar la estabilidad de las variantes mutantes de apoA-I marcadas con la sonda fluorescente pireno, se siguió el mismo proceso descrito previamente. La **Tabla 2.3** resume los parámetros termodinámicos obtenidos del análisis de estas variantes marcadas, donde se agregó el grado de marcación de estas. De la evaluación comparativa de estos parámetros, nuevamente, se pudo observar que, salvo con la mutante F104C, el resto mostraron un comportamiento equivalente, siendo F104C termodinámicamente la menos estable. Cabe recalcar que la incorporación de la sonda fluorescente en la posición F104 no restaura la estabilidad, indicando la relevancia de esta posición en el *cluster* aromático que estabiliza la estructura nativa de apoA-I [62].

**Tabla 2.3: Parámetros termodinámicos en variantes mutantes de apoA-I-Pireno**

Mutante	Grado de marcación	WMF/nm	$D_{1/2}/M_{GdHCl}$	$\Delta G_{H20}^{\circ}/kcal \cdot mol^{-1}$	$m/kcal \cdot mol^{-1} \cdot M_{GdHCl}^{-1}$
WT	(n.a.)	336,93 ± 0,04	0,89 ± 0,03	3,1 ± 0,2	3,5 ± 0,3
WT-NPM	< 6 %	336,8 ± 0,1	0,896 ± 0,004	3,28 ± 0,03	3,67 ± 0,02
F104C-NPM	> 70%	344,2 ± 0,3	0,72 ± 0,02	1,74 ± 0,02	2,52 ± 0,05
K107C-NPM	> 80 %	337,4 ± 0,2	0,83 ± 0,02	2,60 ± 0,01	3,16 ± 0,08
K133C-NPM	> 90 %	336,7 ± 0,6	0,90 ± 0,03	3,25 ± 0,03	3,70 ± 0,08
L137C-NPM	> 87 %	337,0 ± 0,1	0,88 ± 0,03	2,57 ± 0,01	3,0 ± 0,1
F225C-NPM	> 85 %	337,1 ± 0,4	0,84 ± 0,02	2,77 ± 0,07	3,32 ± 0,02
K226C-NPM	> 80 %	338,5 ± 0,1	0,99 ± 0,01	2,48 ± 0,06	2,52 ± 0,06

Los datos se representan como el promedio ± error estándar por triplicado. WMF, longitud de onda máxima de fluorescencia.  $D_{1/2}$ , concentración de GdHCl necesaria para alcanzar el 50 % de proteína desnaturalizada.  $\Delta G_{H20}^{\circ}$ , estabilidad termodinámica en buffer PBS a pH 7,4. m, cooperatividad del proceso de desnaturalización, relacionada con la forma sigmoide de la curva. En la tabla también se muestran el grado de marcación de las mutantes utilizadas y de la marcación inespecífica en apoA-I WT. (n.a.), no aplicable.

En resumen, podemos concluir, que salvo con la mutante F104C, la mutación y la introducción la sonda aromática pireno no altera la estabilidad conformacional en las posiciones 107,

133, 226, 137 y 225 en apoA-I. Además, los resultados *in silico* son equivalentes, indicando la solidez del modelo de apoA-I propuesto por *Melchior et al.* 2017 [40] en apoyar nuestros datos experimentales.

### 2.3.4 Estabilidad *in silico* de apoA-I unida a lípidos

De la misma forma que se evaluó *in silico* la sensibilidad a la mutación en la forma libre de lípidos en apoA-I, se utilizó el mismo método para la forma unida a lípidos en modelos de rHDL. Se utilizó el software FoldX junto con dos estructuras de rHDL, en configuraciones LL5/5 y LL5/2 (residuos en cada molécula de apoA-I: 33-243), que fueron generadas por la Lic. Soledad Lynn como parte de sus trabajos realizados en relación con su beca doctoral. Estas estructuras corresponden a dímeros de apoA-I en un modelo de doble cinturón, en el cual se obvió la presencia de sus lípidos, ya que estos no son interpretados por el software FoldX. Las posiciones seleccionadas fueron: 104, 107, 133, 137, 225 y 226, a excepción de 244 que no existe en estas estructuras. De este análisis se espera obtener una idea general de la relevancia de las posiciones utilizadas en esta Tesis en rHDL, que luego serán contrastadas *in vitro* (ver **Secciones 2.3.5** y **2.3.6**).

El esquema de análisis fue igual al desarrollado en la **Sección 2.3.2**, donde se obvió la estabilización energética de estas estructuras, ya que estas provienen de simulaciones por MD. De esta manera, evitamos cambios conformacionales en la orientación de las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos, que ahora se encuentran en un entorno acuoso (entorno simulado por FoldX). Además, la estabilidad de plegamiento presentado como  $\Delta\Delta G^{\circ}_{\text{Mut-WT}}$  se estimó sobre el complejo de rHDL, donde las sustituciones a evaluar se realizaron al mismo tiempo sobre las dos moléculas de apoA-I. Los resultados de este análisis son mostrados en la **Tabla 2.4**, donde se presenta el efecto de la sustitución por los aminoácidos Cys, Pro, Tyr, Trp y Phe.

La **Tabla 2.4** muestra que en ambas configuraciones (LL5/5 y LL5/2) la sustitución por Pro en las posiciones evaluadas es semejante, a excepción de 107 y 133, donde no puede asignar un efecto desestabilizante ya que la sustitución por Pro no genera ningún efecto. Cabe recalcar que en estas configuraciones todas las posiciones a evaluar se encuentran formando parte de  $\alpha$ -hélices, excepto las posiciones 133 y 137 en una de las dos moléculas de apoA-I en rHDL de configuración LL5/5. La sustitución por residuos de Cys fue equivalente en ambas configuraciones, asignándose un efecto en general desestabilizante en las posiciones 104, 137 y 225. Por otro lado, la sustitución por residuos aromáticos, que como mencionamos en la **Sección 2.3.2** consideramos una aproximación a la unión de la sonda aromática pireno, es neutral o estabilizante en la mayoría de las posiciones, a excepción de 104 con Tyr en rHDL LL5/5 y 137 con sus aminoácidos aromáticos (Tyr, Trp y Phe) en rHDL LL5/2. Cabe recalcar que de la misma forma que se explicó en la **Sección 2.3.2**, este análisis muestra valores diferentes a cero para la sustitución “F104→F”, debido a una orientación distinta en sus cadenas laterales (mutante y apoA-I WT).

**Tabla 2.4: Sensibilidad a la sustitución en LL5/5 y LL5/2 (dHDL)**

Posición	Residuo	LL5/5					LL5/2				
		C	P	Y	W	F	C	P	Y	W	F
104	F	0,8	21,9	0,7	-0,2	-0,3	0,8	2,1	0,1	-0,6	0,1
107	K	-1,4	11,8	-0,3	-0,5	-0,3	-2,6	-0,5	-3,6	-2,5	-3,8
133 <sup>a</sup>	K	-2,2	16	-0,5	-1,2	-2,2	-0,4	-3,2	-1	-0,1	-1,3
137 <sup>a</sup>	L	0,6	1,1	-0,6	-0,8	-0,4	2,2	10,2	6,4	5,4	3
225	F	1,1	6,2	-0,4	-0,6	0	1,1	3,7	-0,1	-0,4	0
226	K	-0,9	2,9	-1,6	-1,6	-2	-0,5	12,4	-1,4	-0,8	-1,2

La sensibilidad a la mutación fue calculada como la diferencia en energía libre en kcal·mol<sup>-1</sup> entre la forma mutante y apoA-I WT ( $\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT}$ ). Para el análisis se utilizaron los modelos propuestos por *Lynn et al.*. Se seleccionaron las posiciones de esta Tesis y los aminoácidos a sustituir de interés: Cys (C), Pro (P), Tyr (Y), Trp (W) y Phe (F). (<sup>a</sup>) Residuos que no forman parte de estructura  $\alpha$ -hélice en una de las dos moléculas de apoA-I en rHDL LL5/5 (en LL5/2 todos sus residuos, en ambas moléculas de apoA-I, forman parte de  $\alpha$ -hélices). Para conocer el efecto de la sustitución se utilizó la escala de color Rojo-Blanco-Azul para los valores de  $\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT}$  propuesta por *Studer et al.* 2014 [134]:

Highly stabilizing,	$\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < -1,84$ ,	Azul
Stabilizing,	$-1,84 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < -0,92$ ,	Azul
Slightly stabilizing,	$-0,92 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < -0,46$ ,	Azul
Neutral,	$-0,46 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < +0,46$ ,	Blanco
Slightly destabilizing,	$+0,46 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < +0,92$ ,	Rojo
Destabilizing,	$+0,92 < \Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} < +1,84$ ,	Rojo
Highly destabilizing,	$\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT} > +1,84$ ,	Rojo

En resumen, hemos presentado aquí un análisis *in silico* de la sensibilidad a la sustitución en las posiciones seleccionadas en esta Tesis (posiciones 104, 107, 133, 137, 225 y 226). En general,

podemos concluir que la posición 137 en rHDL LL5/2 es la única sensible a la sustitución por un equivalente hidrofóbico similar al pireno. Estos resultados servirán como guía a la hora de evaluar la capacidad de estas mutantes marcadas con pireno de formar rHDL *in vitro*.

### 2.3.5 Reconstitución de partículas de HDL por diálisis con colato

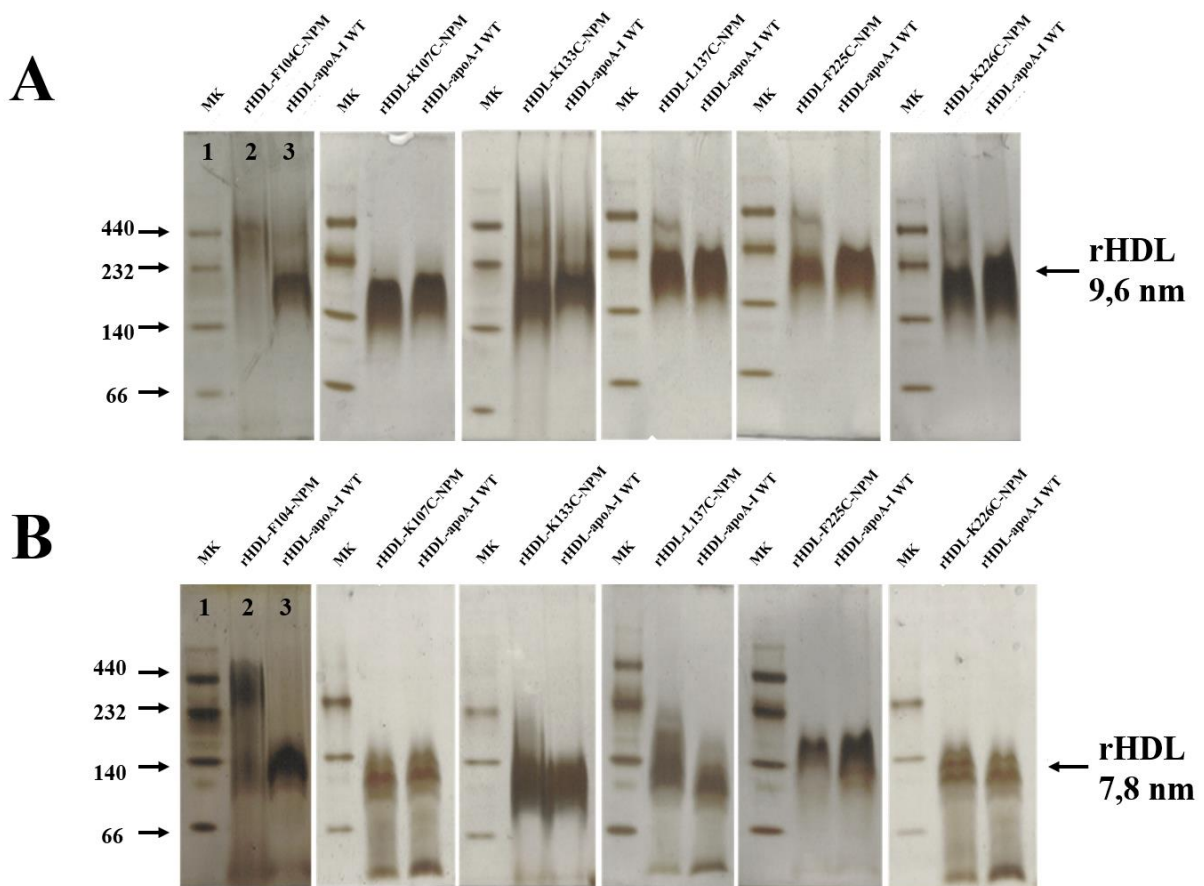
Previamente, evaluamos *in silico* la sensibilidad a la sustitución en modelos de rHDL. Para evaluar estos resultados con rHDL generadas *in vitro*, generamos estas por un método de reconstitución con las variantes mutantes de apoA-I marcadas con pireno generadas en esta Tesis. La reconstitución de rHDL es una herramienta útil y ampliamente utilizada en la caracterización estructural y biológica de mutantes de apoA-I. Estas rHDL se generaron con el fosfolípido POPC por ser un lípido natural encontrado en membranas biológicas. La metodología utilizada en esta sección fue la de diálisis con colato, una técnica que produce rHDL de configuración preferencial LL5/5 según Cuellar *et al.* 2014 [129]. Se utilizaron las variantes marcadas F104C, K107C, K133C, L137C, F225C y K226C, a excepción de la variante +244C que no se encontraba disponible durante los experimentos. De esta manera, se espera determinar cuáles de las variantes generadas son funcionales a través de la formación de estas partículas de rHDL.

La obtención de partículas de rHDL por diálisis con colato se encuentra descrita en materiales y métodos (ver **Sección 4.2.2.1**). Brevemente, esta consiste de una primera etapa de producción de micelas de POPC/colato del tamaño de la partícula a generar. El tamaño de estas micelas puede ser regulado a través la relación entre POPC y colato en la mezcla inicial. Luego, la incubación de estas micelas con apoA-I, a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , y la posterior remoción del colato del medio por diálisis terminan generando las partículas de rHDL del tamaño de interés. Los tamaños escogidos fueron de 7,8 y 9,6 nm, siguiendo las relaciones de 35:1:80 y 95:1:150 entre POPC, apoA-I y colato, respectivamente. Finalmente, una vez generadas estas partículas, el tamaño fue evaluado por

## RESULTADOS

electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (NATIVE-PAGE) 8-25 % más tinción con plata (**Figura 2.10**).

La **Figura 2.10** muestra estos resultados, donde se observó que únicamente la mutante F104C muestra un comportamiento distinto a la apoA-I WT. Esta es ineficiente en lograr formar rHDL del diámetro de interés, formando complejos de mayor tamaño. El resto de las variantes mutantes forma partículas que son equiparables a la observada con apoA-I WT.



**Figura 2.10: Reconstitución de rHDL por diálisis con colato, NATIVO-PAGE 8-25 %.** Las rHDL se generaron siguiendo el método por diálisis con colato para mezclas de distinta relación de POPC:apoA-I:colato. A) Relación (95:1:150) y B) (35:1:80), respectivamente, con las variantes marcadas F104C, K107C, K133C, L137C, F225C y K226C. Con cada relación se representa el tamaño molecular esperado de 9,6 y 7,8 nm, respectivamente. En cada gel el orden de calles es el siguiente: calle 1: marcador de peso molecular (MK) en kDa; calle 2: mutante de rHDL-apoA-I-NPM; y calle 3: rHDL-apoA-I WT. La concentración de proteína utilizada fue de 5  $\mu$ M y el gel fue teñido por tinción con plata. No se numeró los geles restantes.



En resumen, los resultados presentados *in silico* en la sección anterior apoyan los resultados en esta sección, a excepción de la variante F104C. Esta mostró una incapacidad de formar partículas del tamaño deseado, indicando posiblemente que la posición 104, además de ser relevante en apoA-I libre de lípidos, lo es en rHDL.

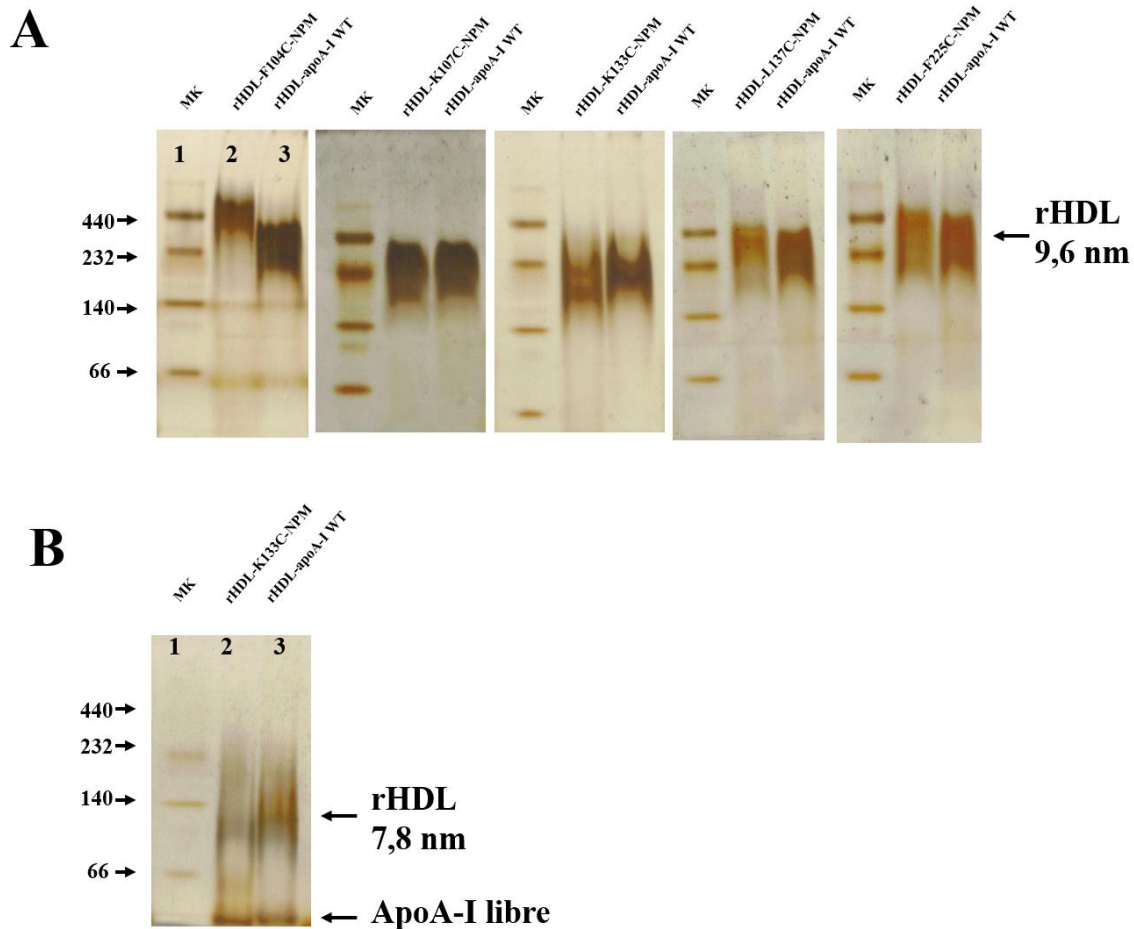
### 2.3.6 Reconstitución de partículas de HDL por microsolubilización directa

Siguiendo el mismo razonamiento presentado en la sección anterior, se generaron partículas de rHDL por la técnica de microsolubilización directa a la temperatura de transición de fase del lípido 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DMPC) a 24 °C. Este método es más exhaustivo en determinar la capacidad funcional de mutantes de apoA-I, ya que da lugar a la interacción directa entre apoA-I y los lípidos a reconstituir, sin necesidad de facilitar ésta utilizando un detergente. La desventaja de este método es que utiliza el lípido DMPC, no comúnmente encontrado en membranas biológicas. Esta técnica genera partículas de configuración preferencial LL5/2 según Cuellar *et al.* 2014 [129]. Se utilizaron las variantes marcadas F104C, K107C, K133C, L137C y F225C, a excepción de K226C y +244C que no se encontraban disponibles durante los experimentos. De esta manera, se espera determinar cuáles de las variantes generadas son funcionales a través de la formación de estas partículas de rHDL, que en conjunto con los resultados de caracterización presentada en secciones previas nos indicará cuales de las variantes mutantes serán útiles en experimentos biofísicos.

La reconstitución por microsolubilización directa consistió de una incubación de la variante mutante marcada con pireno a evaluar (mutantes F104C, K107C, K133C, L137C y F225C) a una concentración de 5  $\mu$ M con vesículas multilamelares (MLV) de DMPC en una relación de 1:80 (apoA-I:DMPC) durante 12 hs a 24 °C, generando así partículas de rHDL, típicamente de 9,6 nm de diámetro. Se escogió únicamente esta relación, ya que una relación inferior de 1:35 (apoA-I:DMPC) genera un rendimiento bajo en la producción de rHDL que dificulta la correcta interpretación de la

capacidad de formación de rHDL (**Figura 2.11 B**). Además, la fracción de proteína que no forma estas partículas (apoA-I libre), contribuye en señal de fluorescencia del pireno a los cambios espectrales de esta sonda en las posiciones evaluadas (ver **Sección 2.7.3**). Finalmente, una vez generadas estas partículas, el tamaño de estas fue evaluado por NATIVE-PAGE 8-25 % más tinción con plata (**Figura 2.11**).

La **Figura 2.11 A** muestra estos resultados, donde nuevamente F104C no fue capaz de formar el tamaño correcto de rHDL cuando se compara con apoA-I WT, observándose un tamaño superior al esperado. El resto de las variantes mutantes marcadas con pireno: K107C, K133C, L137C y F225C, mostraron un comportamiento similar al observado con apoA-I WT, indicando que estas serían funcionales.



**Figura 2.11: Reconstitución de rHDL por microsolubilización directa, NATIVE-PAGE 8-25 %.** Las rHDL se generaron siguiendo el método estándar por microsolubilización directa a la temperatura de transición de fase del lípido DMPC para una mezcla de apoA-I:DMPC. A) Reconstitución a una relación de 1:80 con las variantes marcadas F104C, K107C, K133C, L137C y F225C. B) Ejemplo de reconstitución con una relación de 1:35 con la variante marcada K133C, donde se observa un bajo rendimiento en la producción de rHDL. Con cada relación se representa el tamaño molecular esperado de 9,6 y 7,8 nm, respectivamente. En cada gel, el orden de calles es el siguiente: calle 1: marcador de peso molecular (MK) en kDa; calle 2: mutante de rHDL-apoA-I-NPM; y calle 3: rHDL-apoA-I WT. La concentración de proteína utilizada fue de 5  $\mu$ M y el gel fue teñido por tinción con plata. No se numeró los geles restantes.

En resumen, nuevamente observamos que la variante F104C es la que se comporta de forma diferente a la apoA-I WT. Por otro lado, L137C forma correctamente rHDL a diferencia de lo observado en rHDL de configuración LL5/2 *in silico*. El resto de las variantes (mutantes K107C, K133C, L137C y F225C) mostraron formación de rHDL comparable a apoA-I WT lo que indicaría que serían funcionales.

### 2.3.7 Conclusión

En conclusión, en esta sección se ha evaluado la estabilidad de las distintas variantes mutantes de apoA-I marcadas con pireno *in silico* e *in vitro*, tanto de la forma libre de lípidos como asociada a ellos en rHDL. La **Tabla 2.5** resume estos controles, donde en su mayoría las variantes mutantes se comportaron de forma similar a la apoA-I WT y son ideales para la realización de experimentos biofísicos, a excepción de la variante F104C que fue la más comprometida. La variante +244C, a pesar de no haberla participado en la caracterización estructural y funcional, la utilizaremos ya que la Cys agregada no participa de la estructura terciaria y nos servirá como control negativo en algunos de los experimentos a realizar. Finalmente, con la variante K226C, aunque no tengamos el dato de su capacidad de microsolubilización directa creemos que los controles realizados son suficientes para utilizarla en experimentos biofísicos.

**Tabla 2.5: Parámetros termodinámicos en variantes mutantes de apoA-I**

Mutante	ApoA-I		ApoA-I-NPM		rHDL-NPM				
	FoldX	$D_{1/2}/M_{GdHCl}$	FoldX	$D_{1/2}/M_{GdHCl}$	FoldX		DC <sup>a</sup>		MS <sup>a</sup>
					LL5/5	LL5/2	9,6 nm	7,8 nm	9,6 nm
WT	(n.a.)	0,89 ± 0,03	(n.a.)	0,896 ± 0,004	(n.a.)	(n.a.)	Si	Si	Si
F104C	4,1	0,76 ± 0,03	3,4	0,72 ± 0,02	0,25	-0,25	No	No	No
K107C	0,8	0,84 ± 0,03	0,15	0,83 ± 0,02	-0,4	-3,05 <sup>b</sup>	Si	Si	Si
K133C	0 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,02	-0,15 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,03	-0,85	-0,55 <sup>b</sup>	Si	Si	Si
L137C	0,4 <sup>b</sup>	0,930 ± 0,003	0 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,03	-0,7	5,9	Si	Si	Si
F225C	0,4	0,84 ± 0,05	-0,3	0,84 ± 0,02	-0,5	-0,25	Si	Si	Si
K226C	0,7	(n.d.)	-0,6	0,99 ± 0,01	-1,6	-1,1	Si	Si	(n.d.)
+244C	(n.a.)	(n.d.)	(n.a.)	(n.d.)	(n.a.)	(n.a.)	(n.d.)	(n.d.)	(n.d.)

La tabla resume la caracterización de las variantes mutantes de Cys evaluadas en esta Tesis Doctoral. Donde corresponda los datos se representan como el promedio ± error estándar. FoldX hace referencia al  $\Delta\Delta G^{\circ}_{Mut-WT}$ , estimado en kcal·mol<sup>-1</sup>. La escala de color es la propuesta por Studer *et al.* 2014 [134]. En el caso de apoA-I-NPM libre de lípidos y en rHDL-NPM con FoldX, se reporta el efecto de la sustitución con un equivalente hidrofóbico como el promedio entre la sustitución entre Tyr y Trp (no se incluyó la sustitución por Phe, ya que con algunas de las mutantes generadas se sustituyó este residuo).  $D_{1/2}$ , concentración de GdHCl necesaria para alcanzar el 50 % de proteína desnaturalizada. DC, diálisis con colato. MS, microsolubilización directa. Se asignó con un “Si” si la mutante marcada forma rHDL de forma equivalente a apoA-I WT, en caso contrario se asigna un “No”. (°) La reconstitución con DC y MS se realizó con apoA-I WT sin marcar. (b) No podemos asignar fielmente un valor de sensibilidad a la sustitución ya que en estos casos (apoA-I libre de lípidos y en rHDL) las sustituciones con Pro no fueron desestabilizantes. (n.a.), no aplicable. (n.d.), no determinado.

## 2.4 Oligomerización de apoA-I estudiada con mutantes de cisteína marcadas con pireno

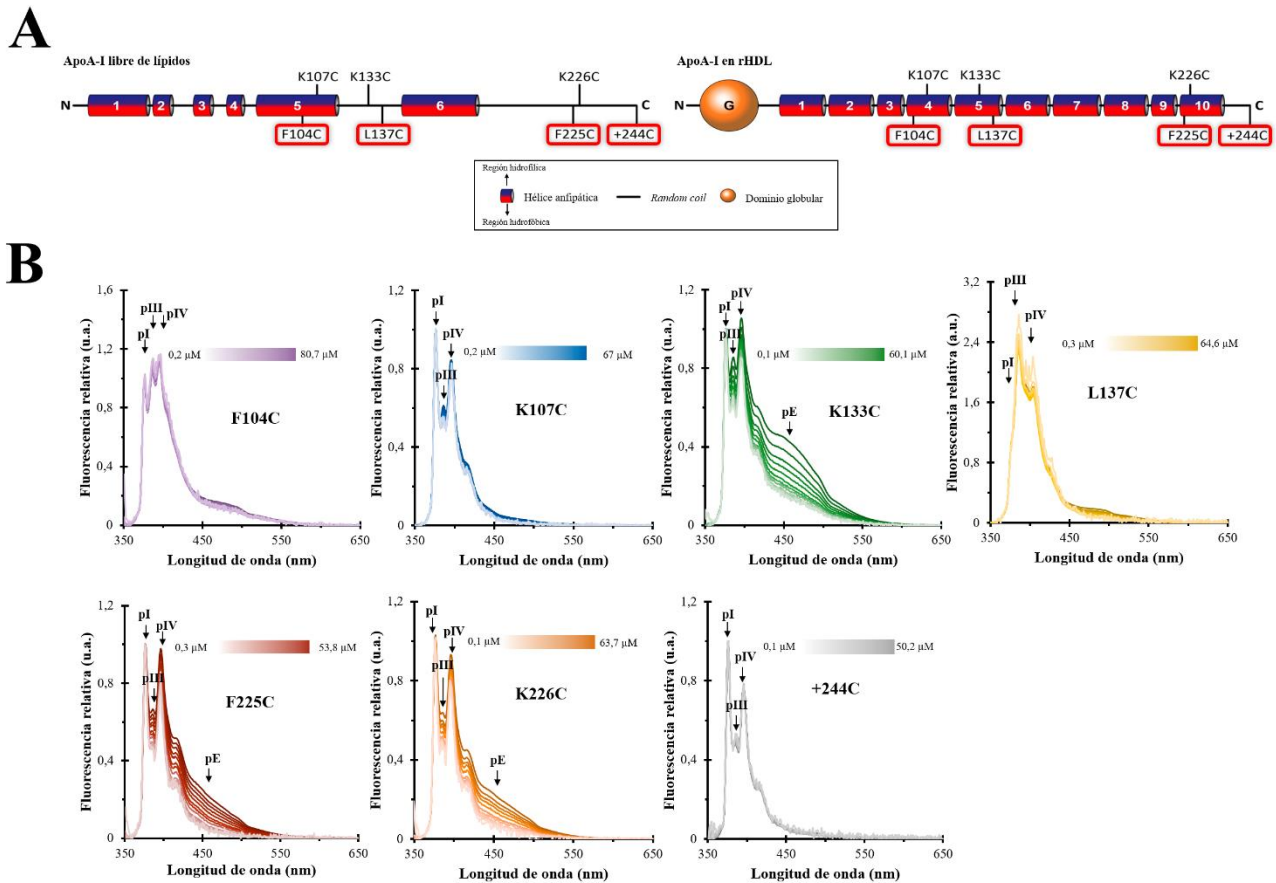
### 2.4.1 Objetivos

Como se explicó en la introducción, apoA-I muestra propiedades de auto-asociación en solución acuosa formando distintas especies oligoméricas. Este proceso ha sido por primera vez descrito desde 1976 por *Vitello et al.* [47] y ha continuado estudiándose desde entonces, aunque su principal rol fisiológico no ha sido resuelto aún.

A partir de un simple cálculo, la concentración plasmática de apoA-I libre de lípidos puede ser estimada en alrededor de 0,15 mg/ml (5  $\mu$ M), en función de la concentración total de apoA-I en plasma (1,5 mg/ml) y el porcentaje que está asociada a HDL (90–95 %), y por lo tanto solo entre el 5 y 10 % se encuentra en su forma libre de lípidos [135–137]. Esta concentración no parece ofrecer margen para la amplia formación de oligómeros, si se considera su función plasmática, pero podría ser importante a nivel de la superficie en membranas biológicas, donde la formación de dHDL necesita la participación de al menos dos moléculas de apoA-I. Por otro lado, se ha observado que la disfunción de apoA-I, a través de modificaciones aminoacídicas [138,139], lleva a la formación de agregados amiloides, pudiendo considerarse este fenómeno como una extensión de los eventos de asociación. Estas observaciones sugieren que la auto-asociación de apoA-I, en particular las distintas especies oligoméricas que se forman, puede cumplir una función importante en el rol protector de apoA-I contra la aterosclerosis. De esta manera, se estudió la auto-asociación de apoA-I en solución con mutantes de Cys marcadas con pireno en posiciones determinantes que son encontradas en rHDL.

### 2.4.2 Oligomerización estudiada con mutantes de cisteína de apoA-I

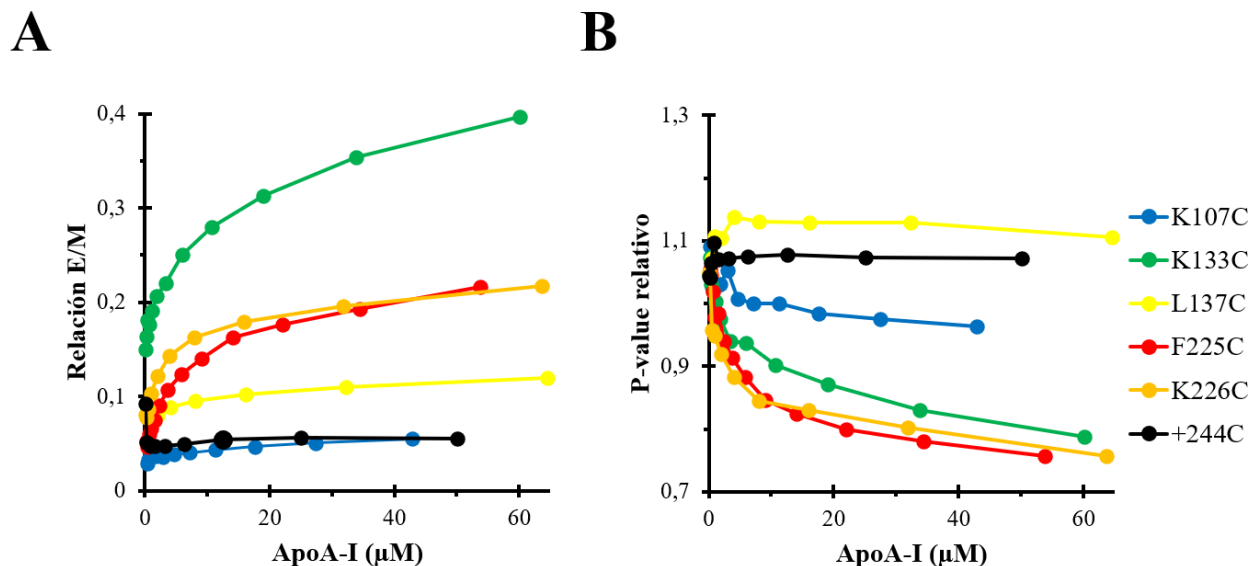
Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de las mutantes de Cys de apoA-I marcados con la sonda pireno (mutantes F104C, K107C, K133C, L137C, F225C, K226C y +244C) como función de la concentración total de proteína. Estas posiciones son esquematizadas para la forma libre de lípidos y en dHDL en la **Figura 2.12 A**. Estos espectros fueron recogidos en muestras individuales a distinta concentración en buffer PBS a pH 7,4 a temperatura ambiente (25 °C). Previamente, las muestras fueron equilibradas durante 2 hs para obtener muestras en el equilibrio a la concentración de medida. El tiempo necesario para lograr el equilibrio después de la preparación fue suficiente según lo registrado por *Zehender et al.* 2012 [54]. En una primera etapa de *screening*, se trabajó entre 0 y 50  $\mu\text{M}$  de concentración de proteína, que debería cubrir la formación desde monómeros a octámeros [54]. La **Figura 2.12 B** muestra estos resultados para las mutantes mencionadas, donde los espectros a distintas concentraciones fueron relativizados a 376 nm (máximo de intensidad de emisión de fluorescencia del pico I), pudiéndose apreciar de esta forma los cambios en la formación de excímero y P-value en las mutantes estudiadas.



**Figura 2.12: Espectros de emisión de fluorescencia en mutantes apoA-I marcados con pireno.** A) Modelos de estructura secundaria de apoA-I para la forma libre y en asociación con lípidos (rHDL), respectivamente. En ambos modelos se muestran las posiciones seleccionadas en el estudio, donde se evaluaron los cambios espectrales del pireno. B) Espectros de emisión de fluorescencia. Los espectros se obtuvieron excitando a 345 nm recogiendo la fluorescencia entre 350 y 650 nm a diferentes concentraciones de apoA-I (color en gradiente). Para mayor claridad, los espectros se relativizan a 376 nm (pI). Los picos más relevantes se señalan con flechas: 376 nm (pI), 384 nm (pIII), 395 nm (pIV) y excímero (pE). Los espectros para las distintas variantes se muestran en color: F104C (violeta), K107C (azul), K133C (verde), L137C (amarillo), F225C (rojo), K226C (naranja) y +244C (negro).

De este primer resultado se pudo observar que había algunas variantes que reportaban cambios espectrales significativos en la fluorescencia del pireno, en especial en la formación de excímeros con las mutantes K133C, F225C y K226C (**Figura 2.12 B**). Para cuantificar estos cambios, se graficaron las relaciones Excímero/Monómero (E/M) y P-value, cociente entre los máximos de emisión de fluorescencia pE/pM (460/395 nm) y pI/pIII (376/384 nm), respectivamente (**Figuras 2.13 A y B**). Para simplificar el análisis se obvió la mutante F104C, ya que la misma no se

comporta en forma equivalente a apoA-I WT según los controles estructurales y funcionales realizados previamente.



**Figura 2.13: Cuantificación de los cambios espectrales en mutantes de apoA-I marcadas con pireno.** A) y B) Cambios en la relación Excímero/Monómero (E/M) y P-value en función de la concentración total de proteína. Para mayor claridad, las curvas de P-value se relativizan al valor reportado a la concentración más baja de proteína (~0,2 μM). Código de color: K107C (azul), K133C (verde), L137C (amarillo), F225C (rojo), K226C (naranja) y +244C (negro).

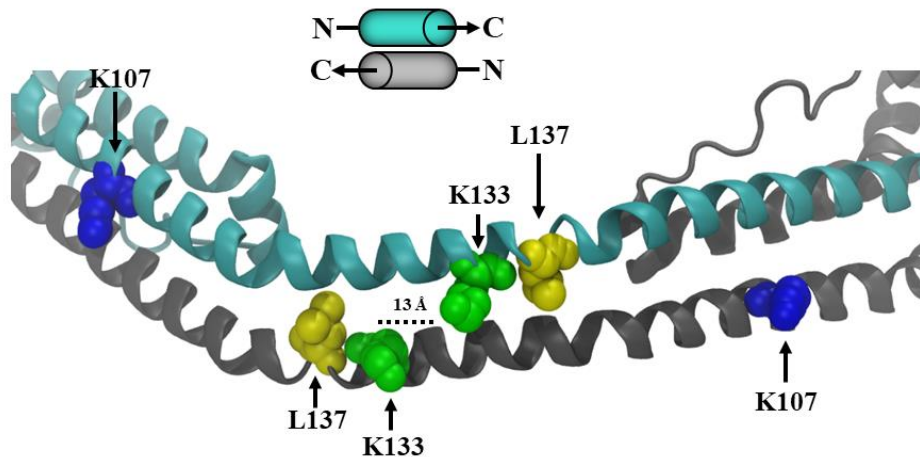
### 2.4.3 Conclusión

En conclusión, estos resultados reportan la formación de excímeros en las posiciones 133, 225 y 226 como función de la concentración total de proteína, indicando que estas posiciones participan en regiones de contacto durante eventos de auto-asociación en apoA-I. A su vez, estos eventos, en las posiciones mencionadas y en la posición 107, están acompañados de cambios de polaridad alrededor de la sonda que son indicativos de un menor grado de exposición al solvente acuoso durante la asociación (entornos hidrofóbicos). Estas observaciones concuerdan con uno de los modelos de dímeros de apoA-I, obtenido por cristalografía de rayos X para la forma truncada de apoA-I [59]. La siguiente figura (**Figura 2.14**) muestra este modelo resaltando las posiciones estudiadas, donde la posición K133 muestra cercanía con su par, a una distancia de 13 Å entre sus



carbonos  $\alpha$ , a diferencia de las posiciones K107 y L137 que se encuentran lejanas especialmente. Por otro lado, las posiciones F225 y K226, en particular la variante K226C, localizadas en la región C-terminal de apoA-I, han sido reportadas en mostrar proximidad a concentraciones  $> 0,1$  mg/ml ( $> 3,5$   $\mu$ M) [140]. A pesar de la bondad del modelo, de las observaciones obtenidas hasta aquí y lo reportado bibliográficamente, no existe un modelo o modelos que respalden todas las observaciones experimentales. Con esto en mente, el siguiente apartado trata de resolver este problema a partir del análisis de los resultados obtenidos en función de la concentración de apoA-I.

### Dímero de apoA-I



**Figura 2.14: Modelo de dímero de apoA-I en ausencia de lípidos.** El modelo es el propuesto por *Mei et al.* 2011 [59] obtenido por cristalografía de rayos X para la forma truncada de apoA-I  $\Delta 185-243$  en ausencia de lípidos. La estructura se encuentra disponible en la *Protein Data Bank* con el código 3R2P para el ensamble biológico (dímero). En línea de puntos se presenta la distancia entre los residuos K133-K133. Código de color: unidad 1 (cian), unidad 2 (gris), K107 (azul), K133 (verde) y L137 (amarillo).

## 2.5 Desarrollo de modelos matemáticos de oligomerización y análisis de mutantes de apoA-I marcadas con pireno

### 2.5.1 Objetivos

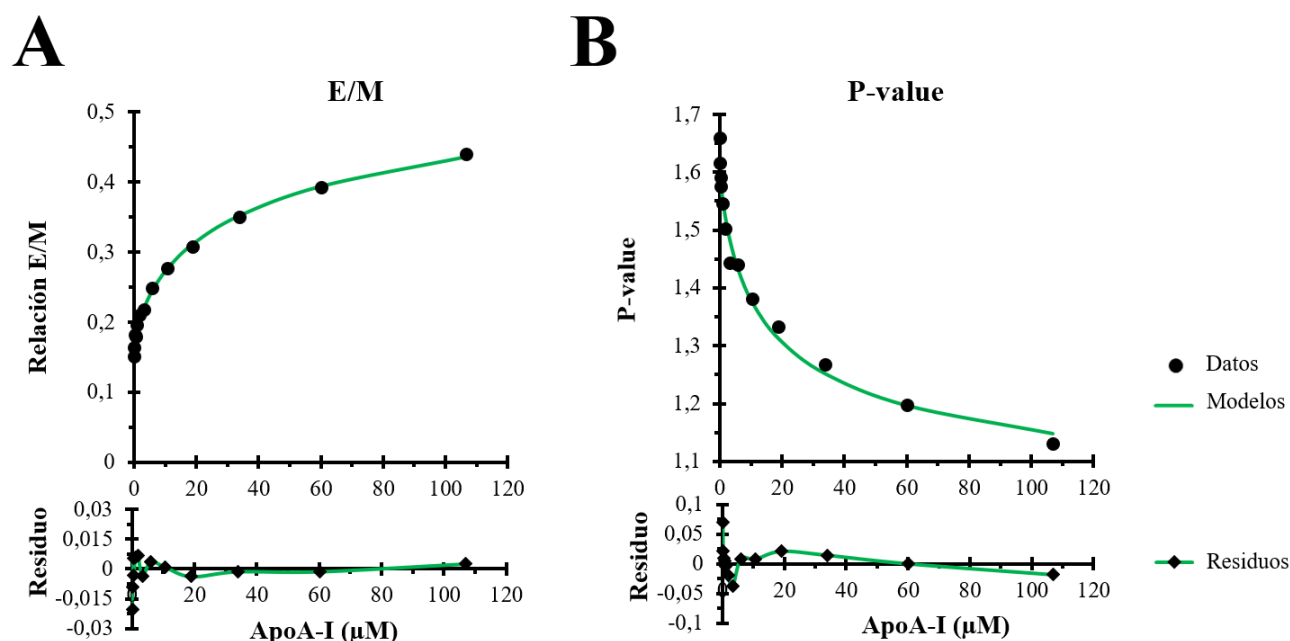
Previamente, logramos evidenciar la auto-asociación en apoA-I con mutantes de Cys marcadas con pireno. Con el objetivo de aprovechar las propiedades multiparamétricas que ofrece esta sonda: proximidad y sensibilidad a la polaridad del entorno, estas fueron estimadas en forma independiente para luego ser analizadas en base a modelos de asociación. Partimos de la suposición de que cada mutante podría censar un evento de oligomerización único, pero potencialmente diferente de acuerdo con la posición de la sonda. Como primera aproximación elegimos tomar modelos de equilibrio único y analizar el ajuste a los datos experimentales obtenidos. Esta primera aproximación nos permitirá caracterizar en forma sencilla los equilibrios de asociación observados en apoA-I.

### 2.5.2 Análisis con modelos de asociación de equilibrio único

Para analizar en detalle los cambios en las propiedades espectrales de la sonda pireno, relacionados a eventos de auto-asociación de mutantes de Cys de apoA-I marcadas, se desarrollaron modelos de asociación de equilibrio único de la forma monómero  $\rightleftharpoons$  dímero ( $2A \rightleftharpoons A_2$ ). Estos modelos nos permiten obtener parámetros de interés que caracterizan los eventos de asociación observados, el más importante fue la constante de asociación ( $K_A$ ). De esta manera, se realizaron dos estimaciones independientes basadas en modelos que evalúan la relación E/M (pE/pIV: 460/395 nm) o P-value (pI/pIII; 396/384 nm) en función de la concentración de apoA-I (**Ecuaciones 18 y 25** en Materiales y Métodos).

El modelo E/M considera el grado de marcación en las mutantes utilizadas, el cual es un valor determinado experimentalmente para cada lote de proteína marcada; y un factor que denominamos eficiencia de formación de excímero (**h2**) que contempla la disminución en la emisión de excímero por configuraciones sub-óptimas entre moléculas de pireno próximas (**Sección 1.5.2**, ver en la Introducción), considerando que contribuyen parte del tiempo como monómeros y parte como excímeros. Por su parte, el modelo P-value fue desarrollado considerando una transición entre dos estados con P-value diferentes. En ambos modelos se consideró el *bleedthrough* entre las ventanas espectrales empleadas y un ajuste con reducción progresiva del peso del error para concentraciones por debajo de 1  $\mu\text{M}$  para de esta manera compensar por la reducción en la relación señal/ruido de los espectros. Los valores de  $K_A$  se estimaron a partir de los espectros corregidos y relativizados por su fluorescencia total, ajustando la relación E/M o las señales de P-value para las variantes de apoA-I que mostraron cambios significativos (**Figura 2.15**).

La **Figura 2.15** muestra, a modo de ejemplo, el ajuste de los modelos a las señales E/M y P-value para la variante K133C; mientras que la **Tabla 2.6** resume los valores de  $K_A$  obtenidos con todas las variantes que mostraron cambios espectrales de pireno. Aunque no se observaron diferencias significativas entre modelos (E/M y P-value en cada variante,  $P > 0,05$ , *Student's t-test*), si se reportaron valores diferentes de  $K_A$  entre variantes a partir de cambios en P-value, lo que sugirió al menos dos equilibrios entre 0,017 y 0,19  $\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$  ( $P < 0,001$  por ANOVA-test y  $P < 0,05$  por *Student's t-test + Bonferroni's post-hoc test*). Por otro lado, el  $K_A$  promedio obtenido a partir del modelo E/M entre las posiciones evaluadas fue de alrededor de 0,3  $\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$  ( $P > 0,05$  por ANOVA-test).



**Figura 2.15: Auto-asociación de apoA-I.** Modelos de asociación de equilibrio único siguiendo la relación E/M o P-value (con seis y diez parámetros, respectivamente). A) Ajuste a datos obtenidos para mutantes que mostraron formación de excímeros (mutantes K133C, F225C y K226C); o B) cambios en P-value (mutantes K133C, F225C, K226C y K107C).

**Tabla 2.6: Estimación de las constantes de auto-asociación en apoA-I a partir de espectros corregidos**

Mutante	E/M		P-value	
	$K_A/\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$	$R^2$	$K_A/\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$	$R^2$
<b>K107C</b>	(n.a.)	(n.a.)	$0,017 \pm 0,005^a$	$> 0,891$
<b>K133C</b>	$0,2 \pm 0,2$	$> 0,992$	$0,04 \pm 0,01^a$	$> 0,952$
<b>F225C</b>	$0,4 \pm 0,2$	$> 0,998$	$0,19 \pm 0,03^b$	$> 0,983$
<b>K226C</b>	$0,31 \pm 0,02$	$> 0,996$	$0,1 \pm 0,1^{a,b}$	$> 0,952$

Los valores de  $K_A$  ( $\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$ ) son reportados como promedios  $\pm$  errores estándar entre preparaciones independientes de proteínas (purificación y marcación): K107C (4), K133C (3), F225C (3) y K226C (2). También se informa el  $R^2$  mínimo para cada mutante. Las diferencias estadísticas se representan con letras diferentes (a, b). Todas las significancias se informan con  $P < 0,05$ . Para K107C (mostrado en cursiva), uno de los valores de  $K_A$  y su  $R^2$  estimado se situó fuera del rango de concentraciones empleado en el análisis ( $1/K_A > 90 \mu\text{M}$ ). (n.a.), no aplicable.

En conclusión, a partir del análisis con modelos de asociación se logró caracterizar más de un evento de asociación en apoA-I, lo que en principio es coherente con la idea de múltiples equilibrios. Por asociación estos equilibrios son indistinguibles, indicando que las posiciones relacionadas a las hélices H5 y H10, participan en eventos de asociación tempranos en apoA-I. Sin embargo, los errores

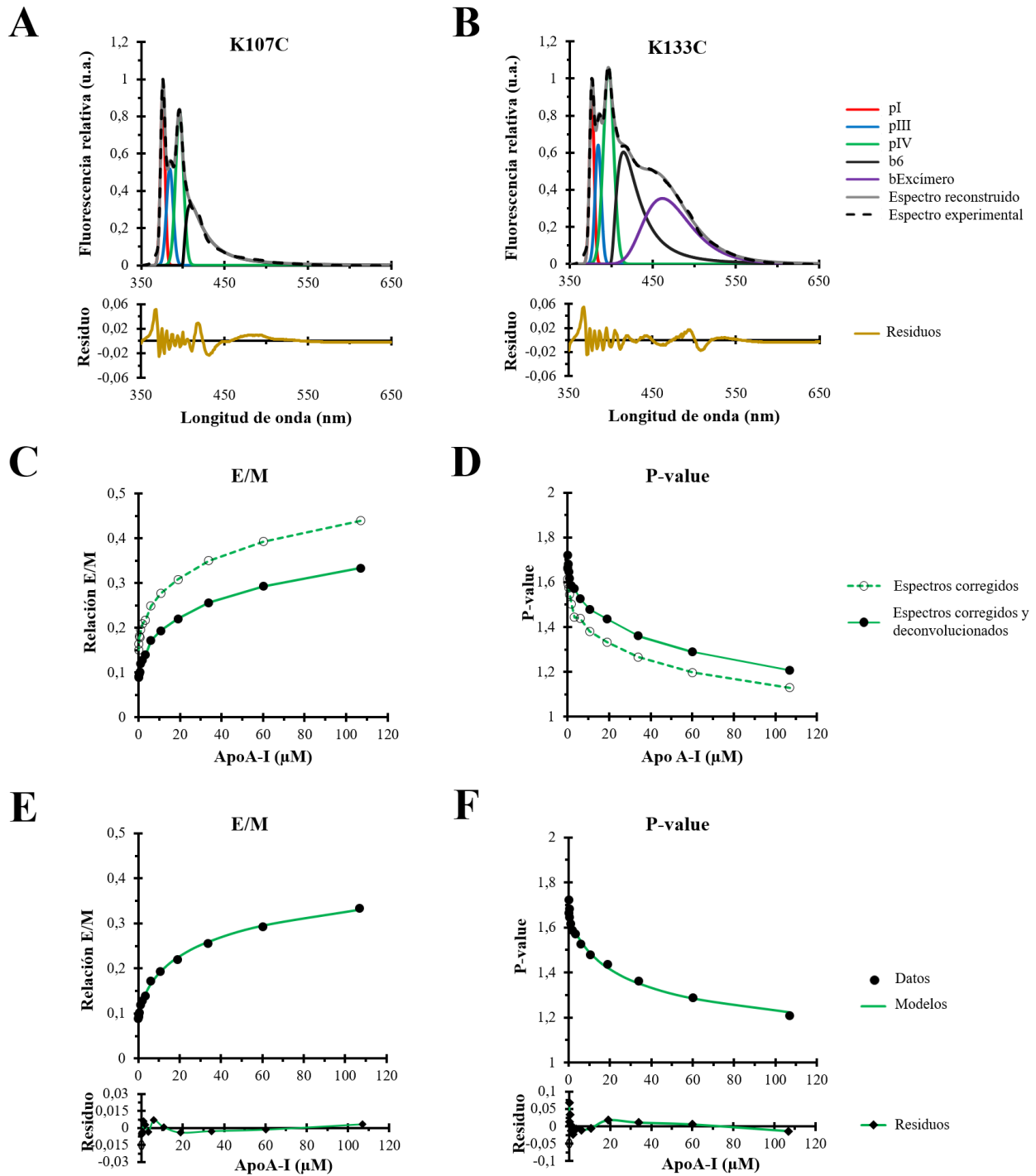
asociados a los valores de  $K_A$ , en particular los que reporta el modelo E/M, son muy grandes, por lo que parece difícil poder identificar diferencias significativas. A continuación, se evalúa la utilidad de aprovechar toda la información de los espectros de pireno para aislar las señales de interés y así mejorar la precisión de los modelos.

### 2.5.3 Deconvolución de espectros de emisión de fluorescencia del pireno

Para mejorar la estimación en los valores de  $K_A$ , calculados en la sección anterior, propusimos un método de deconvolución espectral para aislar la señal específica de cada pico de emisión del pireno previamente al ajuste de los modelos E/M y P-value. La deconvolución se logró ajustando cada espectro a una combinación de distribuciones tipo Gaussianas y tipo Log, de acuerdo con el número y la amplitud de los picos observados en las variantes de apoA-I marcadas con pireno. El mejor resultado fue logrado ajustando la señal a una suma de tres (3) distribuciones tipo Gaussiana y una (1) Log para K107C (**Figura 2.16 A**); mientras que se tuvo que considerar una segunda distribución tipo Log para las variantes que mostraron emisión de excímero (**Figura 2.16 B**). La **Figura 2.16** también muestra cómo la deconvolución de los espectros modificó la relación E/M (**Figura 2.16 C**) y el P-value (**Figura 2.16 D**) para la variante K133C respecto a los datos que sólo fueron corregidos por *background* y Raman. Cabe destacar que el método pierde precisión a concentraciones por debajo de 1  $\mu\text{M}$ , que es compensado por un ajuste ponderado por el error por debajo de aquella concentración.

De esta manera, empleamos espectros corregidos y deconvolucionados para ajustar los modelos de auto-asociación de apoA-I de equilibrio único, de forma análoga a la sección anterior, pero evitando el *bleedthrough*. Los valores de  $K_A$  fueron recalculados para todas las variantes de apoA-I (**Tabla 2.7**). En general, este procedimiento dio como resultado ajustes buenos, como los de la sección anterior, pero con la ventaja de que se requieren menos parámetros. Asimismo, se observó una dispersión menor de los parámetros aproximados. La comparación de  $K_A$  obtenidas para los

diferentes mutantes mostró de nuevo las mismas diferencias significativas obtenidas anteriormente, pero con errores considerablemente menores, particularmente en el caso del  $K_A$  reportado con el modelo E/M (**Tabla 2.7**). La variante K226C no mostró diferencia notable cuando se comparó con las otras variantes. Además, una diferencia significativa entre los valores de  $K_A$  obtenidos de la relación E/M y P-value es evidente para K133C ( $P < 0,05$  por *Student's t-test*), lo que sugiere que esta variante marcada con pireno por sí sola puede diferenciar dos procesos de equilibrio diferentes al monitorear diferentes ventanas espectrales del pireno. A esto se le suma la diferencia obtenida con la variante F225C entre datos sin deconvolucionar y deconvolucionados ( $P < 0,05$  por *Student's t-test*).



**Figura 2.16: Deconvolución de espectros de pireno y ajuste a modelos de asociación de equilibrio único.** A) y B) Ejemplos de deconvolución para espectros de emisión de pireno para una combinación de cuatro (mutante K107C) y cinco (mutante K133C) distribuciones tipo Gaussiana y Log, respectivamente. En cada espectro, los componentes se muestran en diferentes colores: pI (rojo), pIII (azul), pIV (verde), b6 (negro), bExcímero (violeta), espectro reconstruido (gris), espectro experimental (línea negra discontinua). Para mayor claridad, los espectros se relativizaron a la emisión de pI. C) y D) Titulaciones representativas para la variante K133C que muestra los mismos datos de E/M y P-value calculados para los espectros corregidos (círculos blancos) y corregidos más deconvolucionados (círculos negros). E) y F) Ajustes representativos con los modelos E/M y P-value, a partir de espectros corregidos y deconvolucionados con la variante K133C.

**Tabla 2.7: Estimación de las constantes de auto-asociación en apoA-I a partir de espectros corregidos y deconvolucionados**

Mutante	E/M		P-value	
	$K_A/\mu M_{dim} \cdot \mu M_{mon}^{-2}$	$R^2$	$K_A/\mu M_{dim} \cdot \mu M_{mon}^{-2}$	$R^2$
<b>K107C</b>	(n.a.)	(n.a.)	$0,014 \pm 0,003^a$	$> 0,866$
<b>K133C</b>	$0,09 \pm 0,02^*$	$> 0,997$	$0,021 \pm 0,006^{a,*}$	$> 0,948$
<b>F225C</b>	$0,16 \pm 0,08$	$> 0,998$	$0,12 \pm 0,02^{b,\#}$	$> 0,965$
<b>K226C</b>	$0,27 \pm 0,09$	$> 0,975$	$0,07 \pm 0,04^{a,b}$	$> 0,962$

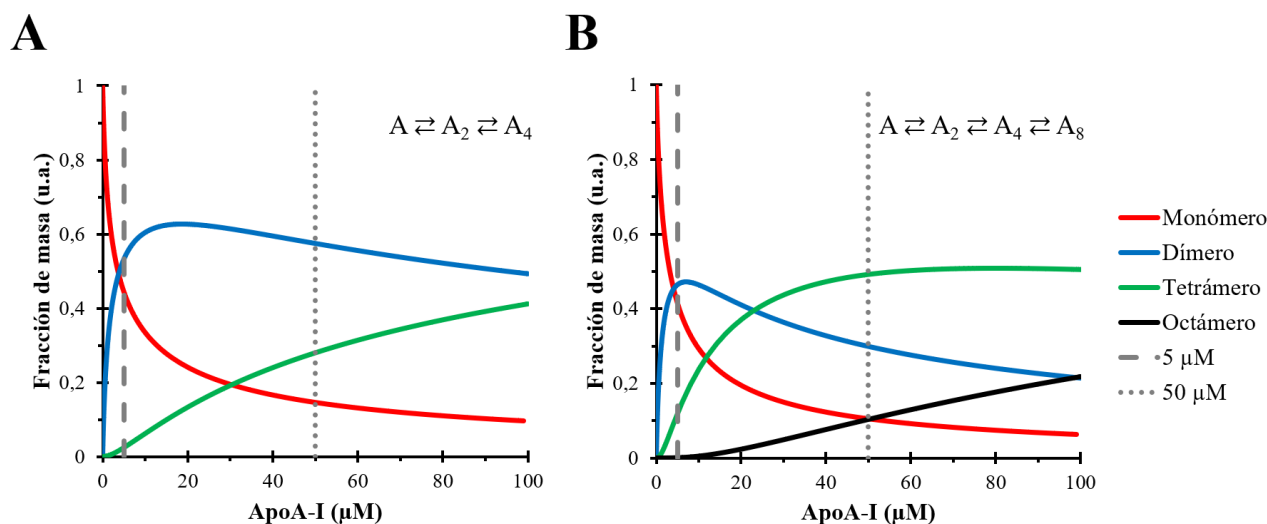
Los valores de  $K_A$  ( $\mu M_{dim} \cdot \mu M_{mon}^{-2}$ ) son reportados como promedios  $\pm$  errores estándar entre preparaciones independientes de proteínas (purificación y marcación): K107C (4), K133C (3), F225C (3) y K226C (2). También se informa el  $R^2$  mínimo para cada mutante. Las diferencias estadísticas se representan con letras diferentes (a, b). Además, (\*) indica diferencias significativas entre los valores de  $K_A$  estimados con modelos E/M y de P-value, mientras que (#) indica diferencias significativas entre los valores de  $K_A$  estimados a partir de los espectros corregido y corregido y deconvolucionado. Todas las significancias se informan con  $P < 0,05$ . (n.a.), no aplicable.

En resumen, se han empleado mutantes Cys de apoA-I marcados con la sonda fluorescente pireno para analizar sus mecanismos de auto-asociación, relacionando posiciones o regiones específicas con la formación de oligómeros. Como se mencionó, las posiciones 107, 133 y 226 se tomaron como punto de partida sobre la base de resultados anteriores con rHDL y estudios por FRET realizados por *Cuellar et al.* 2014 [129], donde las posiciones 107 y 133 eran útiles para distinguir dos conformaciones diferentes de dímeros de apoA-I en rHDL, mientras que la posición 226 actuaba como control negativo. En esta sección nosotros reportamos valores de  $K_A$  ( $K_A$ , 0,014-0,27  $\mu M_{dim} \cdot \mu M_{mon}^{-2}$ ) para eventos de auto-asociación que están en su mayoría de acuerdo con los publicados previamente usando otras técnicas ( $K_A$ , 0,13–0,76  $\mu M^{-1}$ , ITC, AUC y DLS [53]. Además, hemos observado un equilibrio con una afinidad menor en un orden de magnitud ( $K_A$ , 0,014  $\mu M_{dim} \cdot \mu M_{mon}^{-2}$ ). Sin embargo, no podemos descartar completamente que los valores de  $K_A$  informados no se vean afectados por interacciones adicionales hidrofóbicas y de apilamiento  $\pi$  establecidas por la sonda fluorescente. No obstante, dado que las mutantes L137C y +244C no muestran cambios espectrales significativos, la marcación con pireno no parece ser suficiente para promover interacciones aberrantes.



## 2.5.4 Conclusión

En conclusión, según el análisis en los valores de  $K_A$  presentados en esta sección, hemos podido distinguir dos equilibrios diferentes en el proceso de auto-asociación de apoA-I. El primer evento de alta afinidad se observó por la formación de excímeros debido al contacto entre las hélices H10 ( $K_A, 0,27 \pm 0,09 \mu M_{\text{dim}} \cdot \mu M_{\text{mon}}^{-2}$ ), mientras que el segundo evento de menor afinidad fue representado por los cambios en P-value alrededor de las hélices H4 y H5 ( $K_A, 0,014 \pm 0,003$  y  $0,021 \pm 0,006 \mu M_{\text{dim}} \cdot \mu M_{\text{mon}}^{-2}$ , respectivamente). Además, hemos estimado otras constantes de equilibrio intermedias entre los eventos de alta y baja afinidades que podrían estar representando un potencial tercero, pero su discriminación no alcanzó la confianza estadística. La identificación de al menos dos de estos eventos de asociación diferentes nos permitió predecir la distribución de especies utilizando un modelo de asociación secuencial que combina los resultados para todas las variantes de apoA-I probadas. Este modelo fue seleccionado porque mantiene los supuestos iniciales empleados para la estimación de los valores de  $K_A$ , en los que dos especies idénticas dimerizan para formar una sola partícula. Estas distribuciones de especies son presentadas en la **Figura 2.17** junto con las concentraciones de apoA-I libre de lípidos y la total esperada en plasma, 5 y 50  $\mu M$ , respectivamente. Es así que podemos observar que el 50 % de apoA-I a 5  $\mu M$  en plasma se encuentra en forma dimérica, mientras que a 50  $\mu M$  todas las especies están presentes. De esta manera, como conclusión tentativa al rol fisiológico de apoA-I, podemos decir que esta ejerce su función normal (reconstitución de dHDL) en forma dimérica mientras que, en determinadas situaciones patológicas, que llevan al desplazamiento de apoA-I asociada a HDL hacia su forma libre, la forma funcional de apoA-I son sus distintas especies oligoméricas (tetrámero y octámero).



**Figura 2.17: Distribución de especies de apoA-I.** La distribución entre especies de oligómeros, en función de la concentración de apoA-I, se calculó en base a las  $K_A$  presentadas en la **Tabla 2.7**. A) y B) representan estas distribuciones calculadas usando dos y tres equilibrios, respectivamente. Se distinguieron estos equilibrios basados en el análisis de ANOVA ( $P < 0,01$ ) más la prueba *Tukey-Kramer post-hoc* test ( $P < 0,1$ ). Se asignaron dos equilibrios en A), descartando el equilibrio intermedio no diferenciado completamente, pero incluido en B). En ambos casos, se empleó un modelo de auto-asociación secuencial (descrito en cada gráfico). Código de color: monómero (A, rojo), dímero ( $A_2$ , azul), tetrámero ( $A_4$ , verde) y octámero ( $A_8$ , negro). Como referencias, se incluyeron las concentraciones normales aproximadas de apoA-I libre de lípidos (5  $\mu\text{M}$ , línea gris discontinua) y la total (50  $\mu\text{M}$ , línea gris discontinua) en plasma.

## 2.6 Análisis con modelos de asociación múltiple

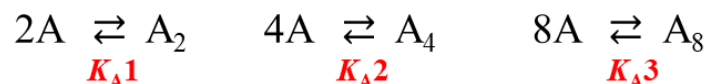
### 2.6.1 Objetivos

Como se ha mencionado en la introducción, la naturaleza dinámica de apoA-I en solución es compleja. La proteína tiende a auto-asociarse en solución acuosa formando múltiples estructuras oligoméricas, donde estas podrían influir en procesos de interacción con membranas y formación de partículas de HDL. En el apartado anterior, se logró caracterizar este fenómeno asociando los cambios espectrales de variantes de apoA-I marcadas con pireno a modelos de asociación de equilibrio único; pero también se observó que había discrepancias entre distintas señales, como por ejemplo las  $K_A$  estimadas con K133C-NPM a partir de las señales de E/M y P-value; lo que sugiere que la sonda podría reportar más de un evento de asociación. De esta manera, y conociendo que la auto-asociación involucra más de un equilibrio, decidimos abordar este fenómeno con modelos de equilibrios múltiples. Realizando una búsqueda bibliográfica, encontramos que diferentes autores ya habían propuesto diferentes esquemas de auto-asociación, cada uno sustentado por su propia metodología (**Tabla 1.2**, ver en la Introducción). La **Figura 2.18** muestra los modelos más representativos, incluido el propuesto en nuestro laboratorio: un modelo de asociación que se caracteriza por la asociación progresiva de distintas especies oligoméricas. De esta manera, en este apartado, nos proponemos como objetivo analizar la validez de estos modelos y tratar de ganar más información con respecto a los diferentes eventos de asociación de apoA-I en solución acuosa en base a las características multiparamétricas de la sonda pireno.

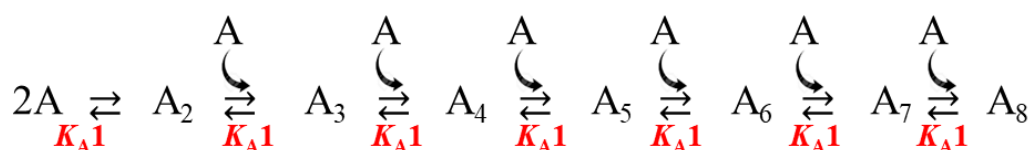
Modelo de asociación secuencial progresiva (M1)



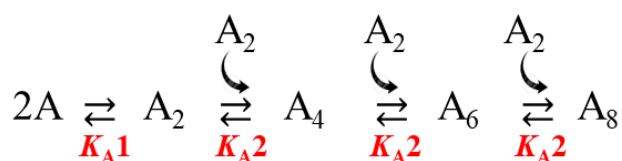
Modelo de asociación discreta (M2)



Modelo de asociación indefinida por adición de monómeros (M3)



Modelo de asociación indefinida por adición de dímeros (M4)



**Figura 2.18: Esquemas de auto-asociación propuestos en apoA-I.** **M1**, asociación secuencial progresiva para 4 especies y 3  $K_A$ . **M2**, asociación discreta para 4 especies y 3  $K_A$  con equilibrios independientes [47]. **M3**, asociación indefinida por adición de monómeros para 8 especies y 1  $K_A$  (este modelo es una variante del propuesto por *Zehender et al.* 2012 [53], donde en el primer equilibrio se agregaba un factor de nucleación  $\alpha$  en la forma  $\alpha \cdot K_A1$ ). **M4**, asociación indefinida por adición de dímeros para 5 especies y 2  $K_A$  (este modelo también es una variante del propuesto por *Prieto et al.* 2011 [52] para una única  $K_A$ ). Todos estos esquemas presentan equilibrios relacionados, a excepción de **M2** donde sus equilibrios son independientes. Las  $K_A$  se encuentran resaltadas en rojo y **An** refiere a la especie oligomérica con **n** sub-unidades.

### 2.6.2 Modelos de asociación múltiple

En esta sección se pretende mostrar el procedimiento utilizado en el análisis de nuestros resultados de emisión de fluorescencia del pireno con modelos de asociación múltiple. Para empezar, se mostrará cómo se llevó a cabo la adquisición y el procesamiento de los espectros de emisión de fluorescencia del pireno. Después, cómo se desarrollaron los distintos modelos de asociación múltiple presentados en la **Figura 2.18**. Luego cómo se llevó a cabo el ajuste entre los datos

experimentales y los modelos desarrollados. Y por último, cuál fue el procedimiento para seleccionar el o los mejores modelos que describen nuestros datos experimentales de auto-asociación de apoA-I. Finalmente, este proceso será luego aplicado con las variantes marcadas que mostraron cambios en el espectro del pireno. De esta manera, esperamos obtener parámetros que describan los eventos de auto-asociación de apoA-I, en especial los valores de  $K_A$  que describen estos equilibrios.

Se utilizaron las variantes mutantes de Cys que en conjunto mostraron cambios en la formación de excímero y P-value (mutantes K133C y F225C, a excepción de K226C que no se encontraba disponible durante la realización de los experimentos) y las que solo mostraron cambios en P-value (mutante K107C). Para empezar, las condiciones de adquisición de datos fueron iguales a las presentadas en la **Sección 2.4**: proteína disuelta en buffer PBS a pH 7,4 previamente equilibrada durante 2 hs a 25 °C. Se duplicó la cantidad de observaciones en el diseño experimental midiendo entre 25 y 30 muestras con un factor de dilución de alrededor del 20 % entre cada muestra. Se midieron espectros de emisión de fluorescencia excitando a 345 nm y recogiendo la emisión entre 350 y 650 nm. Luego estos espectros fueron corregidos por la fluorescencia del buffer y por el efecto de filtro interno. Finalmente, estos fueron relativizados por su fluorescencia total, para así apreciar los cambios espectrales, y luego deconvolucionados con cinco componentes en el caso de que haya formación de excímero (mutantes K133C y F225C), o cuatro (mutante K107C) en el caso de su ausencia. De esta manera, seleccionamos los máximos de emisión de fluorescencia de los componentes deconvolucionados (pI, pIII, pIV y pE), pero tomándolas como señales independientes, en lugar de considerar la relación entre dos de ellas. Estas señales son las utilizadas para realizar los ajustes a los modelos de asociación desarrollados.

Como se detalló en la **Figura 2.18**, existen diferentes esquemas de asociación múltiple que denominamos: M1, secuencial progresiva; M2, discreta; M3, indefinida por adición de monómeros; y M4, indefinida por adición de dímeros. Teniendo en cuenta cada uno de estos esquemas, hemos desarrollado modelos matemáticos de asociación para cada ventana de emisión, cuatro modelos (pI,

pIII, pIV y pE) en el caso de que haya formación de excímero (mutantes K133C y F225C), o dos modelos (pI y pIII) en el caso de su ausencia (mutante K107C). Estos modelos se desarrollaron obviando el *bleedthrough* entre las ventanas examinadas, en base a los resultados presentados en la **Sección 2.5.3**. Cabe destacar que con esta aproximación se reduce el número total de parámetros en los modelos.

Por otro lado, para tener en cuenta el alcance real de nuestros modelos en el sistema estudiado (mutantes de Cys de apoA-I marcadas con pireno), se partió del modelo más complejo (que incluía el mayor número de equilibrios y especies, desde monómero hasta octámero). Luego cada uno de ellos fue sucesivamente simplificado progresivamente para generar “sub-modelos” limitando el número de especies involucradas y su capacidad de formar excímeros. Esencialmente, se consideró que una vez se forma el excímero, este no se desarma cuando se forma la especie siguiente (en particular en M1, M3 y M4). Por el contrario, en el caso particular del modelo M3, se obviaron estas simplificaciones para  $n < 8$ , donde  $n$  representa las sub-unidades en un oligómero. Esto fue así para reducir el número de modelos a evaluar con M3. Además, cabe recalcar que se trabajó con una variante de este modelo (M3), en el cual obviamos la incorporación del factor de nucleación  $\alpha$ , ya que éste toma valores “reales” en un rango que depende del sub-modelo evaluado, de esta forma, aumentado significativamente los tiempos de cálculo y la confianza en los valores de los parámetros determinados. Finalmente, estos modelos son mostrados en la **Tabla 2.8**. En total se desarrollaron 24 y 13 modelos para cuatro y dos ventanas, respectivamente, donde la complejidad de estos se vio reflejada en el número total de sus parámetros, variando entre 10 y 40 en el primer caso, y entre 5 y 17 para el segundo. Cada uno de estos modelos se caracteriza por presentar los siguientes parámetros: constantes de asociación definidas para cada equilibrio ( $K_{Aq}$ , donde  $q$  refiere al equilibrio de asociación evaluado); eficiencias de formación de excímero para cada oligómero con  $n$  sub-unidades ( $h_n$ ); fluorescencias específicas de los picos I y III para cada especie  $An$  ( $Y_{pIA_n}$  y  $Y_{pIIIA_n}$ ); y fluorescencias específicas de los picos IV y E, que denominamos  $Y_{mAn}$  y  $Y_{eAn}$ ,

respectivamente. Para ver el desarrollo paso a paso de cada uno de estos modelos, la **Sección 4.3.3** muestra este desarrollo en forma completa para M1 que fue desarrollado con el software *Wolfram Mathematica* 11.3.

**Tabla 2.8: Modelos de asociación múltiple**

Esquema de asociación	Modelos de asociación			
	Nomenclatura	pI, pIII, pIV y pE	Nomenclatura	pI y pIII
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	M1_A8E3	22		
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	M1_A8E2	20	M1_A8	11
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	M1_A8E1	18		
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	M1_A4E2	16	M1_A4	8
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	M1_A4E1	14		
$A \rightleftharpoons A_2$	M1_A2E1	10	M1_A2	5
$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	M2_A8E3	22		
$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	M2_A8E2	20	M2_A8	11
$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	M2_A8E1	18		
$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	M2_A4E2	16	M2_A4	8
$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	M2_A4E1	14		
$A \rightleftharpoons A_2$	M2_A2E1	10	M2_A2	5
$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A$	M3_A8E7	40	M3_A8	17
$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_7$	M3_A7E6	35	M3_A7	15
$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_6$	M3_A6E5	30	M3_A6	13
$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_5$	M3_A5E4	25	M3_A5	11
$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_4$	M3_A4E3	20	M3_A4	9
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_3$	M3_A3E2	15	M3_A3	7
$A \rightleftharpoons A_2$	M3_A2E1	10	M3_A2	5
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	M4_A8E4	26		
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	M4_A8E3	24	M4_A8	12
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	M4_A8E2	22		
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	M4_A8E1	20		
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	M4_A6E3	21	M4_A6	10
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	M4_A6E2	19		
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	M4_A6E1	17		
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	M4_A4E2	16	M4_A4	8
$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	M4_A4E1	14		
$A \rightleftharpoons A_2$	M4_A2E1	10	M4_A2	5

En la tabla se representa el número total de parámetros para cuatro modelos de asociación múltiple. Los modelos son desarrollados para cuatro y dos ventanas de emisión de fluorescencia. Cada sub-modelo se encuentra descrito con un código, M(a)\_A(b)E(c) si hay formación de excímero, o M(a)\_A(b) si este no se forma. En cada caso, (a) representa el modelo de asociación, (b) la especie oligomérica de mayor tamaño, y (c) el número de especies que forman excímeros. Los modelos de asociación utilizados son: 1, secuencial progresiva; 2, discreta; 3, por adición indefinida de monómeros; y 4, por adición indefinida de dímeros. En cada esquema se resalta en verde aquellas especies (An) que pueden formar excímeros y en gris aquellos modelos redundantes (es decir que ya se encuentran descritos).

Los ajustes se llevaron a cabo de tal manera de que proporcionen valores coherentes en los parámetros de interés y que no requieran mucho tiempo de análisis. Se empleó un ajuste conjunto entre las cuatro ventanas de emisión y sus correspondientes modelos, donde las discrepancias se evaluaron en forma conjunta. Además, se ponderaron las distintas intensidades de fluorescencia en

cada ventana a un valor único y se disminuyó en forma lineal el peso del error a concentraciones por debajo de  $1 \mu\text{M}$  para compensar por la falta de sensibilidad en estas muestras más diluidas. Asimismo, para reducir el tiempo de análisis y obtener valores reales de estos, acotamos los valores que pueden tomar cada parámetro y asignamos una determinada tendencia a cada uno de ellos. Estas toman en cuenta la forma de los equilibrios y cómo se relacionan entre sí, tales como el número de especies, la cantidad de  $K_A$  definidas y la relación entre sus equilibrios. Todas estas restricciones y el ajuste fueron realizados con el software *Wolfram Mathematica* 11.3. La **Tabla 2.9** sintetiza estas restricciones y tendencias, y son brevemente explicadas a continuación:

- 1) Los valores de  $K_A$  para más de un equilibrio disminuyen en forma progresiva. Por ejemplo, para el modelo M1 estas disminuyen de la forma:  $K_{A1} > K_{A2}$  y  $K_{A2} > K_{A3}$ . Esta tendencia fue aplicada en aquellos modelos con asociación progresiva tales como M1 y M4, a excepción de M3 que solo presenta una única  $K_A$ . Cabe aclarar que estas tendencias también se aplicaron en el modelo M2, que presenta equilibrios independientes y por lo tanto disminuyen en base a la definición de sus  $K_A$  y de los valores en  $\mu\text{M}$  reportados por *Vitello et al.* 1976 [47].
- 2) Los valores de eficiencia de formación de excímero (**hn**) aumentan en forma progresiva, en base a que un excímero preformado se estabiliza en un oligómero de mayor tamaño. Por ejemplo, para M1 las restricciones son de la forma:  $h_8 \geq h_4$  y  $h_4 \geq h_2$ . Estas restricciones se aplicaron en aquellos modelos que presentan asociación progresiva tales como M1, M3 y M4, a excepción M2 que presenta equilibrios independientes y por lo tanto posee **hn** no relacionados.
- 3) Las fluorescencias específicas en pI y pIII (**YpIAn** y **YpIIIAn**) evolucionan acorde a los cambios de polaridad observados por P-value. Estas tendencias fueron agregadas considerando una disminución progresiva de la polaridad del microentorno alrededor de la sonda fluorescente, que es observable de los datos experimentales. Es necesario aclarar que no se consideró agregar tendencias (incremento o disminución) a estos parámetros en forma individual, ya que no tenemos información suficiente para decidir cómo estos evolucionan con los cambios de polaridad, en particular el pIII.



Aun así, estas tendencias fueron evaluadas durante el ajuste, evitando aquellos modelos que presentan cambios repentinos o con tendencias poco claras en sus valores.

4) Las fluorescencias específicas del pIV y pE (**YmAn** y **YeAn**) incrementan progresivamente en base al efecto que tiene el entorno sobre el rendimiento cuántico del pireno. Cabe aclarar que la fluorescencia total evoluciona linealmente con la concentración total de proteína (**Figura 4.1**, ver en Materiales y Métodos) y por lo tanto los cambios en las **YmAn** y **YeAn** son sutiles, aunque consideradas.

**Tabla 2.9: Restricciones en los parámetros**

p	M1	M2	M3	M4
$K_A$	$K_{A1} > K_{A2}, K_{A2} > K_{A3}$	$K_{A1} > K_{A2}, K_{A2} > K_{A3}$	(n.a.)	$K_{A1} > K_{A2}$
hn	$\sum_{i=2}^{i=\{2,3\}} h(2^i) \geq h(2^{(i-1)})$	(n.a.)	$\sum_{i=2}^{i=\{3,4,5,6,7,8\}} h(i) \geq h(i-1) \cdot \frac{(i-1)}{i}$	$\sum_{i=4}^{i=\{4,6,8\}} h(i) \geq \frac{h(i-2) \cdot (i-2) + h2 \cdot 2}{i}$
YpIAAn	$\sum_{i=1}^{i=\{1,2,3\}} \frac{YpIA(2^i)}{YpIIIA(2^i)} \geq \frac{YpIA(2^{(i-1)})}{YpIA(2^{(i-1)})}$	$\sum_{i=1}^{i=\{1,2,3\}} \frac{YpIA(2^i)}{YpIIIA(2^i)} \geq \frac{YpIA(2^{(i-1)})}{YpIA(2^{(i-1)})}$	$\sum_{i=2}^{i=\{2,3,4,5,6,7,8\}} \frac{YpIA(i)}{YpIIIA(i)} \geq \frac{YpIA(i-1)}{YpIIIA(i-1)}$	$\sum_{i=4}^{i=\{4,6,8\}} \frac{YpIA(i)}{YpIIIA(i)} \geq \frac{YpIA(i-2)}{YpIIIA(i-2)}$
YmAn	$\sum_{i=1}^{i=\{1,2,3\}} YmA(2^i) \geq YmA(2^{(i-1)})$	$\sum_{i=1}^{i=\{1,2,3\}} YmA(2^i) \geq YmA(2^{(i-1)})$	$\sum_{i=2}^{i=\{2,3,4,5,6,7,8\}} YmA(i) \geq YmA(i-1)$	$\sum_{i=4}^{i=\{4,6,8\}} Ym(i) \geq YmA(i-2)$
YeAn	$\sum_{i=2}^{i=\{2,3\}} YeA(2^i) \geq YeA(2^{(i-1)})$	$\sum_{i=2}^{i=\{2,3\}} YeA(2^i) \geq YeA(2^{(i-1)})$	$\sum_{i=3}^{i=\{3,4,5,6,7,8\}} YeA(i) \geq YeA(i-1)$	$\sum_{i=4}^{i=\{4,6,8\}} YeA(i) \geq YeA(i-2)$

La tabla muestra el comportamiento asignado a los parámetros que describen cada modelo de asociación. En cada caso, la sumatoria es definida para el máximo estado de oligomerización (octámero). Con cada parámetro se da por explícito que la especie monomérica posee una unidad. (n.a.), no aplicable. p, parámetro a evaluar.

Una vez finalizado el ajuste de nuestros modelos a datos de señal de fluorescencia, se evaluaron un conjunto de criterios que permiten seleccionar el o los mejores modelos que apoyan nuestras observaciones experimentales. Cada uno de estos criterios evalúa de una forma diferente y son utilizados en el siguiente orden: bondad del ajuste → criterios de información → inspección manual.

1) **Bondad del ajuste**

- Suma total de residuos (SSE). Este criterio evalúa la calidad de un ajuste a un modelo, calculado las diferencias entre los datos experimentales y los obtenidos por el modelo.

- $R^2$  y  $R^2$ Ajustado. Estos criterios se basan en el SSE, aunque evaluando en forma absoluta la suma total de residuos. Además, en este último se toma en cuenta el número de datos experimentales ( $N$ ) y los parámetros del modelo ( $p$ ).

### 2) Criterios de información

- Los criterios de información evalúan la capacidad predictiva de un modelo, penalizando la bondad de un ajuste (usualmente como el logaritmo del valor máximo de la función de verosimilitud, ver **Sección 4.4.2.2**) con el número total de parámetros ( $p$ ). Modelos con una buena capacidad predictiva, entre un conjunto de modelos, presentan valores mínimos en este criterio.

- Criterio de información de *Akaike* (AIC). Este criterio es el más ampliamente utilizado. Usualmente, los valores de AIC se presentan como la diferencia con respecto al AIC mínimo entre un conjunto de modelos de distinta complejidad,  $\Delta AIC = AIC - AIC_{\min}$ .

- AIC corregido (AICc). Este criterio se basa en el AIC, aunque, adicionalmente, considera el número total de datos experimentales ( $N$ ).

- Criterio de información bayesiano (BIC). Al igual que el AICc, este criterio penaliza por la cantidad de datos experimentales ( $N$ ) aunque de una forma distinta. El AICc penaliza en la forma  $(2 \cdot p^2 + 2 \cdot p) / (N - p - 1)$ , mientras que el BIC con el  $p \cdot \ln(N)$ .

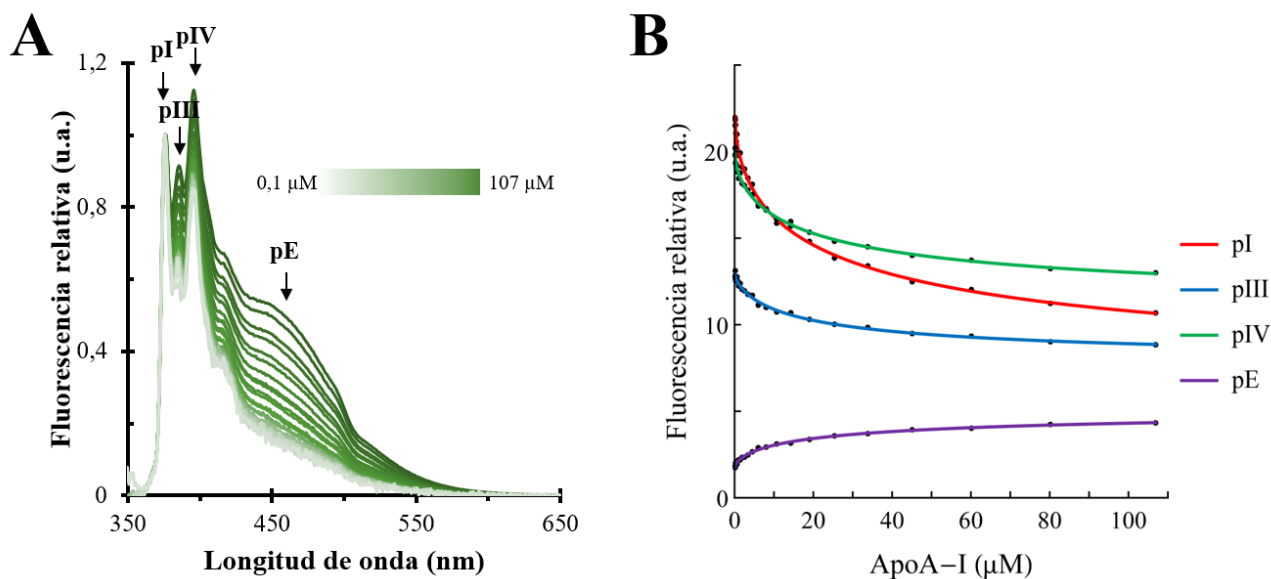
- Como se desconoce qué magnitud de estos criterios constituye una diferencia significativa, *Burnham y Anderson et al.* 2001 [141] propusieron la siguiente regla para valores de  $\Delta AIC$ :  $< 2$ , relación sustancial; entre 4 y 7, relación considerablemente menor; y  $> 10$ , esencialmente ninguna relación. Este criterio es también aplicable con AICc si se cumple que  $N > p + 2$ .

### 3) Inspección manual

- Evaluación visual de los ajustes. El ajuste a cada modelo debe ser coherente a los datos experimentales a lo largo de la titulación en sus cuatro ventanas de emisión.

- Evaluación de la distribución de residuos. Se espera una distribución de residuos sin tendencias en el rango de concentraciones de proteína evaluado. Además, en paralelo se determina el tipo de distribución por *Pearson's chi-squared test*.
- Evaluación del comportamiento de los parámetros. En cada ajuste se definieron valores límites que pueden tomar cada parámetro teniendo en cuenta los datos de fluorescencia y de concentración de proteína, y de las tendencias asignadas a cada parámetro (**Tabla 2.9**). Se espera que estos no alcancen sus valores límite y que muestren una evolución gradual sin cambios repentinos.

Resumiendo, acabamos de presentar la metodología desarrollada para analizar nuestros datos experimentales. A continuación, a modo de ejemplo y para facilitar su evaluación, se mostrará este análisis con la variante mutante K133C marcada con pireno y con un modelo M1 y sus seis sub-modelos de distinta complejidad. La **Figura 2.19** muestra un ejemplo de un ajuste con la variante K133C-NPM. En la **Tabla 2.10** se resume los criterios de selección evaluados, donde los modelos M1\_A8E3, M1\_A8E2 y M1\_A4E2 presentaron valores mínimos en sus residuos totales (SSE), que fue además acompañado de una distribución uniforme de estos (**Figura 2.20**). Por otro lado, en estos gráficos se pudo observar también que los modelos con una única especie formando excímero (M1\_A8E1, M1\_A4E1 y M1\_A2E1) muestran una ligera tendencia no deseada en la distribución de sus residuos a concentraciones altas de proteína, indicando que los excímeros podrían tener lugar con al menos dos especies. Finalmente, si evaluamos los criterios de información (AIC, AICc y BIC), sobre estos sub-modelos con valores mínimos en SSE, se observa que el mejor sub-modelo es el M1\_A4E2 (dos equilibrios, tres especies y dos formando excímeros), ya que el aumento de complejidad de este para incluir un equilibrio y una especie más no es compensado por una reducción significativa de los residuos del ajuste.

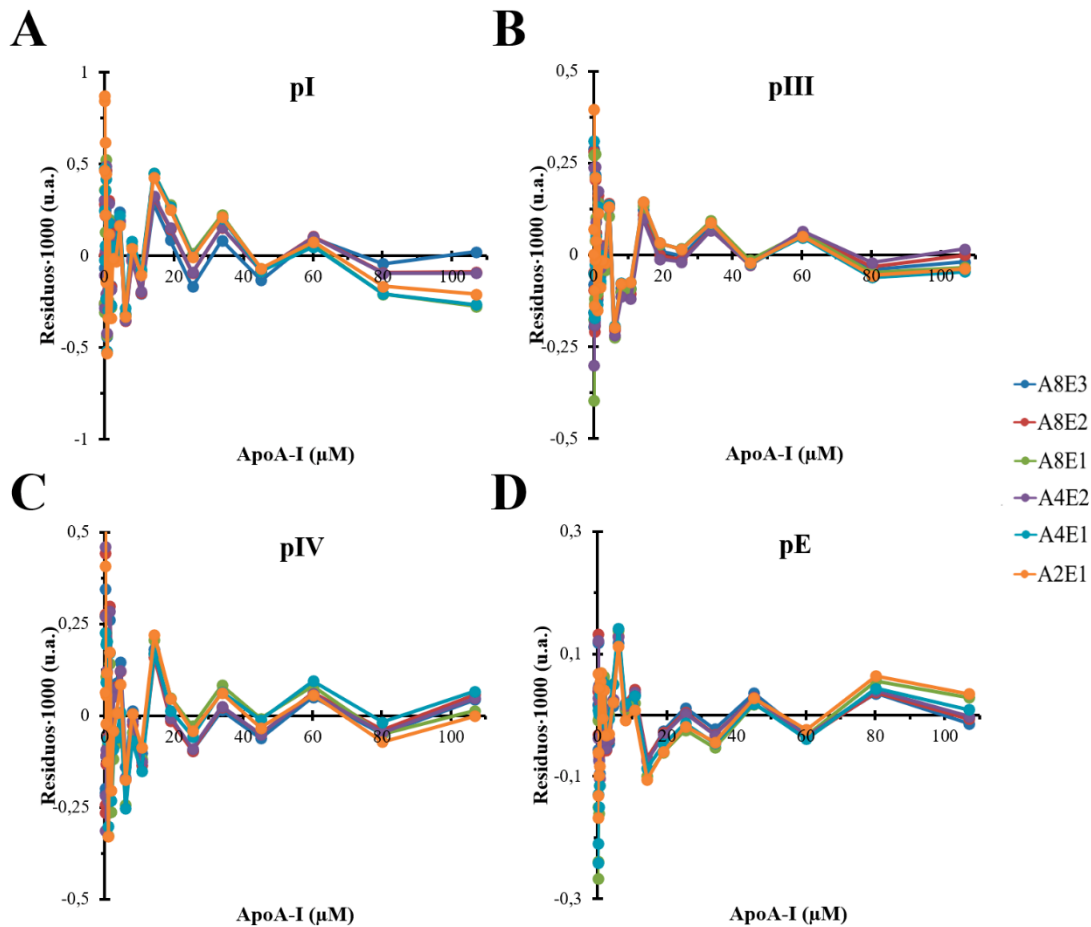


**Figura 2.19: Ajuste a un modelo de asociación múltiple, M1\_A8E3.** A) Espectros de emisión de fluorescencia con K133C-NPM, donde estos fueron relativizados por el pico I (376 nm). B) Ajuste con el modelo M1\_A8E3. Los valores de emisión de fluorescencia provienen de espectros relativizados por sus intensidades totales, y multiplicados por 1000. Para una mayor precisión en los ajustes ver **Figura A.1** en el Anexo. Código de color: pI (rojo), pIII (azul), pIV (verde) y pE (violeta).

**Tabla 2.10: Selección de modelos con K133C-NPM, M1**

Modelo <sup>a</sup>	Esquema <sup>a</sup>	Parámetros <sup>b</sup>	SSE <sup>c</sup>	$\Delta AIC$ <sup>d</sup>	$\Delta AICc$ <sup>d</sup>	$\Delta BIC$ <sup>d</sup>	Distribución de residuos <sup>e</sup>	Comportamiento de parámetros <sup>f</sup>
M1_A8E3	A $\rightleftharpoons$ A <sub>2</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>4</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>8</sub>	22	11,44	9	16	25	Aceptable	Aceptable
M1_A8E2	A $\rightleftharpoons$ A <sub>2</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>4</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>8</sub>	20	11,39	7	12	18	Aceptable	Aceptable
M1_A8E1	A $\rightleftharpoons$ A <sub>2</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>4</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>8</sub>	18	15,68	49	51	54	Aceptable	No aceptable
M1_A4E2	A $\rightleftharpoons$ A <sub>2</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>4</sub>	16	11,83	0	0	0	Aceptable	Aceptable
M1_A4E1	A $\rightleftharpoons$ A <sub>2</sub> $\rightleftharpoons$ A <sub>4</sub>	14	14,65	33	31	27	Aceptable	Aceptable
M1_A2E1	A $\rightleftharpoons$ A <sub>2</sub>	10	14,88	23	19	8	Aceptable	Aceptable

La tabla describe el análisis con la variante K133C-NPM y un modelo de asociación secuencial progresiva (M1). Se muestran los resultados para un set de datos experimentales de 25 espectros. <sup>(a)</sup> Modelo y esquema de asociación. <sup>(b)</sup> Número total de parámetros en cada sub-modelo. <sup>(c)</sup> Bondad del ajuste evaluado a través de la suma total de residuos (SSE:1000). En los sub-modelos evaluados el R<sup>2</sup> y el R<sup>2</sup>Ajustado reportaron valores similares de alrededor de 0,99 (datos no mostrados en la tabla). <sup>(d)</sup> Criterios de información AIC, AICc y BIC expresados como diferencias respecto a su valor mínimo. <sup>(e)</sup> Confianza en la distribución de residuos a lo largo de la titulación registrada en sus cuatro ventanas (**Figura 2.20**). <sup>(f)</sup> Confianza en los valores de los parámetros obtenidos (fluorescencias específicas). En todos los modelos se cumple  $N > p + 2$ , donde N indica el número de datos experimentales (4 veces los espectros adquiridos, en nuestro caso 100) y p el número de parámetros, condición requerida para utilizar el AICc. Para seguir el análisis se utiliza un gradiente de color entre rojo y verde: verde: valor esperado, y rojo: valor inesperado.



**Figura 2.20: Distribución de residuos para M1.** Se representan los residuos (diferencias entre el modelo y los datos experimentales) en función de la concentración total de proteína para cuatro ventanas de emisión: pI, pIII, pIV y pE. M1\_A8E3, (azul), M1\_A8E2 (rojo), M1\_A8E1 (verde), M1\_A4E2 (violeta), M1\_A4E1 (azul claro) y M1\_A2E1 (naranja).

Como se mencionó, también tuvimos en cuenta el cumplimiento de las restricciones impuestas durante el ajuste en cada uno de nuestros parámetros. La tendencia en los valores de **YpIAn**, **YpIIIAn**, **YmAn** y **YeAn** con los sub-modelos M1 son esperados en nuestro sistema, a excepción de M1\_A8E1 (Figura A.2, ver en el Anexo). Además, con los valores de  $K_A$ , que son presentados en la Tabla 2.11 por triplicado, no se logró determinar con precisión el valor de  $K_A$  del primer evento de asociación, pero sí del segundo con un valor de  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}_{\text{tet}} \cdot \mu\text{M}_{\text{dim}}^{-2}$  para M1\_A4E2. Es probable que el primer evento suceda por debajo de la cota inferior de concentración, mientras que con el segundo podemos estar seguros que se da dentro del rango de concentraciones

evaluado. De esta manera, para un modelo M1, con la variante K133C marcada con pireno, el mejor sub-modelo es M1\_A4E2.

**Tabla 2.11: Constantes de asociación calculadas con K133C-NPM, M1**

Modelo	Esquema	$K_A1/\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$	$K_A2/\mu\text{M}_{\text{tet}} \cdot \mu\text{M}_{\text{dim}}^{-2}$	$K_A3/\mu\text{M}_{\text{oct}} \cdot \mu\text{M}_{\text{tet}}^{-2}$
M1_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$5 \pm 3$	$0,14 \pm 0,05^b$	$0,09 \pm 0,08^b$
M1_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$5 \pm 3^a$	$5 \pm 3^a$	$0,11 \pm 0,02$
M1_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$8 \pm 3^a$	$8 \pm 3^a$	$0,24 \pm 0,05$
M1_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$5 \pm 3$	$0,05 \pm 0,01$	(n.a.)
M1_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$8 \pm 3$	$0,09 \pm 0,01$	(n.a.)
M1_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,047 \pm 0,003$	(n.a.)	(n.a.)

Los valores de  $K_A$  son presentados como su promedio  $\pm$  error estándar por triplicado. En cursiva se resaltan aquellos valores de  $K_A$  que en al menos una de sus repeticiones iguala la cota superior que actúa como restricción (inversa del valor mínimo de concentración). En rojo se resaltan aquellos sub-modelos que en al menos una de sus repeticiones no muestran un comportamiento esperado en sus fluorescencias específicas, o una distribución de residuos uniforme. En azul se resalta el sub-modelo que mejor reproduce los datos experimentales. (a) y (b) Con estos valores de  $K_A$ , en al menos una de sus repeticiones, no se cumplen las restricciones  $K_A1 > K_A2$  y/o  $K_A2 > K_A3$ , respectivamente (se obtiene una igualdad entre sus valores). (n.a.), no aplicable.

El mismo procedimiento desarrollado con M1 fue aplicado con todos los modelos de asociación múltiple previamente descritos (Tabla 2.12). Primero, se pudo apreciar que M1 sigue siendo el mejor modelo en reproducir nuestros datos de fluorescencia. Luego M2 presentó buenos resultados, pero falló en estimar fielmente sus valores de  $K_A$  (Tabla A.1, ver en el Anexo). Cabe destacar que a pesar de que este modelo proporciona buenos resultados en sus criterios de información, en particular M2\_A4E2, no creemos que este sea el que describa la auto-asociación de apoA-I, por presentar equilibrios independientes. Por otro lado, M3 también reprodujo fielmente los datos experimentales, aunque con más parámetros, lo que se refleja en sus criterios de información, además de presentar tendencias no deseadas en sus fluorescencias específicas. Cabe recalcar que, inicialmente, este modelo de asociación (M3) fue contrastado con M2 por *Vittelo et al.* 1976 [47], donde reportaron que no era el ideal en reproducir datos de AUC con apoA-I de suero humano. Por último, M4 también reprodujo nuestros datos de fluorescencia hasta M4\_A4E2, que en términos del número de parámetros es igual al M1. Con estos resultados, el mejor sub-modelo es M1\_A4E2 y el segundo mejor correspondería a M4\_A6E3.

Tabla 2.12: Selección de modelos con K133C-NPM

Modelo <sup>a</sup>	Esquema <sup>a</sup>	Parámetros <sup>b</sup>	SSE <sup>c</sup>	$\Delta AIC$ <sup>d</sup>	$\Delta AICc$ <sup>d</sup>	$\Delta BIC$ <sup>d</sup>	Distribución de residuos <sup>e</sup>	Comportamiento de parámetros <sup>f</sup>	
M1	M1_A8E3	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	22	11,44	9	16	25	Aceptable	Aceptable
	M1_A8E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	20	11,39	7	12	18	Aceptable	Aceptable
	M1_A8E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	18	15,68	49	51	54	Aceptable	No aceptable
	M1_A4E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4$	16	11,83	0	0	0	Aceptable	Aceptable
	M1_A4E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4$	14	14,65	33	31	27	Aceptable	Aceptable
	M1_A2E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3$	10	14,88	23	19	8	Aceptable	Aceptable
M2	M2_A8E3	$A_2 \rightleftharpoons A_3; A_2 \rightleftharpoons A_4; A_2 \rightleftharpoons A_8$	22	11,54	10	17	26	Aceptable	Aceptable
	M2_A8E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3; A_2 \rightleftharpoons A_4; A_2 \rightleftharpoons A_8$	20	14,83	49	53	59	Aceptable	No aceptable
	M2_A8E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3; A_2 \rightleftharpoons A_4; A_2 \rightleftharpoons A_8$	18	60,70	327	329	333	No aceptable	(n.a.)
	M2_A4E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3; A_2 \rightleftharpoons A_4$	16	11,83	0	0	0	Aceptable	Aceptable
	M2_A4E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3; A_2 \rightleftharpoons A_4$	14	14,65	33	31	27	Aceptable	Aceptable
	M2_A2E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3$	10	14,88	23	19	8	Aceptable	Aceptable
M3	M3_A8E7	$A_2 \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_8$	40	11,29	52	104	115	Aceptable	No aceptable
	M3_A7E6	$A_2 \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_7$	35	11,48	40	75	90	Aceptable	No aceptable
	M3_A6E5	$A_2 \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_6$	30	11,71	30	52	66	Aceptable	No aceptable
	M3_A5E4	$A_2 \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_5$	25	12,15	22	34	46	Aceptable	No aceptable
	M3_A4E3	$A_2 \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_4$	20	12,97	19	23	29	Aceptable	No aceptable
	M3_A3E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4$	15	15,71	43	42	40	Aceptable	Aceptable
M3_A2E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3$	10	14,88	23	19	8	Aceptable	Aceptable	
M4	M4_A8E4	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	26	11,23	17	31	43	Aceptable	No aceptable
	M4_A8E3	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	24	12,27	25	35	46	Aceptable	No aceptable
	M4_A8E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	22	14,55	49	56	65	Aceptable	No aceptable
	M4_A8E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	20	14,79	46	50	56	Aceptable	No aceptable
	M4_A6E3	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	21	11,76	10	16	23	Aceptable	Aceptable
	M4_A6E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	19	13,90	33	36	41	Aceptable	Aceptable
	M4_A6E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	17	15,45	45	46	47	Aceptable	Aceptable
	M4_A4E2	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4$	16	11,83	0	0	0	Aceptable	Aceptable
	M4_A4E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons A_4$	14	14,65	33	31	27	Aceptable	Aceptable
M4_A2E1	$A_2 \rightleftharpoons A_3$	10	14,88	23	19	8	Aceptable	Aceptable	

La tabla describe el análisis con la variante K133C-NPM y cuatro modelos de asociación múltiple. Se muestran los resultados para un set de datos experimentales de 25 espectros. (a) Modelo y esquema de asociación. (b) Número total de parámetros para cada sub-modelo. (c) Bondad de ajuste evaluada a través de la suma total de residuos (SSE:1000). Los criterios  $R^2$  y  $R^2$ Ajustado reportaron valores similares alrededor de 0,99 (datos no mostrados en la tabla). (d) Criterios de información AIC, AICc y BIC expresados como diferencias respecto a su valor mínimo. (e) Confianza en la distribución de residuos a lo largo de la titulación registrada en sus cuatro ventanas. (f) Confianza en los parámetros obtenidos, donde se asigna (n.a.), no aplicable, cuando no hay un ajuste adecuado. En todos los modelos se cumple  $N > p + 2$ , donde  $N$  indica el número de datos experimentales (4 veces los espectros adquiridos, en nuestro caso 100) y  $p$  el número de parámetros, condición requerida para utilizar AICc. Para seguir el análisis se utiliza un gradiente de color entre rojo y verde, verde: valor esperado y rojo: valor inesperado.

Para concluir con esta sección, el mismo procedimiento de análisis con K133C-NPM fue aplicado con las variantes K107C y F225C, teniendo una representante de cada hélice: H4 (K107C), H5 (K133C) y H10 (F225C). La **Tabla 2.13** muestra estos resultados con los valores de  $K_A$  obtenidos y las distribuciones de especies correspondientes (**Figura 2.21**), donde las conclusiones más relevantes de este análisis fueron:

- 1) El mejor sub-modelo en representar los datos experimentales con K133C-NPM correspondió a un modelo de asociación secuencial progresiva M1\_A4E2. Con respecto a la variante F225C-NPM, siguiendo los criterios de información los mejores sub-modelos fueron M1\_A8E3, M1\_A8E2 y M2\_A8E3 (**Tabla A.2**, ver en el Anexo), aunque estos no presentaron valores coherentes en sus

valores de  $K_A$  (**Tabla A.3**, ver en el Anexo), que indican que solo dos equilibrios están siendo registrados. Es así que elegimos los segundos mejores sub-modelos para dos equilibrios que corresponden a M1\_A4E2 y M2\_A4E2, siendo el primero en representar con un menor error estándar los equilibrios observados con la variante F225C-NPM. Finalmente, con la variante K107C-NPM el mejor sub-modelo fue M1\_A2 con un segundo mejor M3\_A3. Debido a que con las variantes mutantes K133C y F225C descartamos el modelo M3, escogimos el modelo M1\_A2 como aquel que describe la auto-asociación con K107C-NPM (**Tabla A.4** y **Tabla A.5**, ver en el Anexo).

2) En las posiciones 133 y 225 se observaron asociaciones tempranas por debajo de 5  $\mu$ M, probablemente dímeros. Cabe destacar que con la variante K133C se reportó una  $K_A$  que no se logró determinar con precisión indicando que su valor verdadero tendría lugar por debajo de la concentración mínima de apoA-I evaluada que coincide con la temprana señal de excímero observada con esta variante.

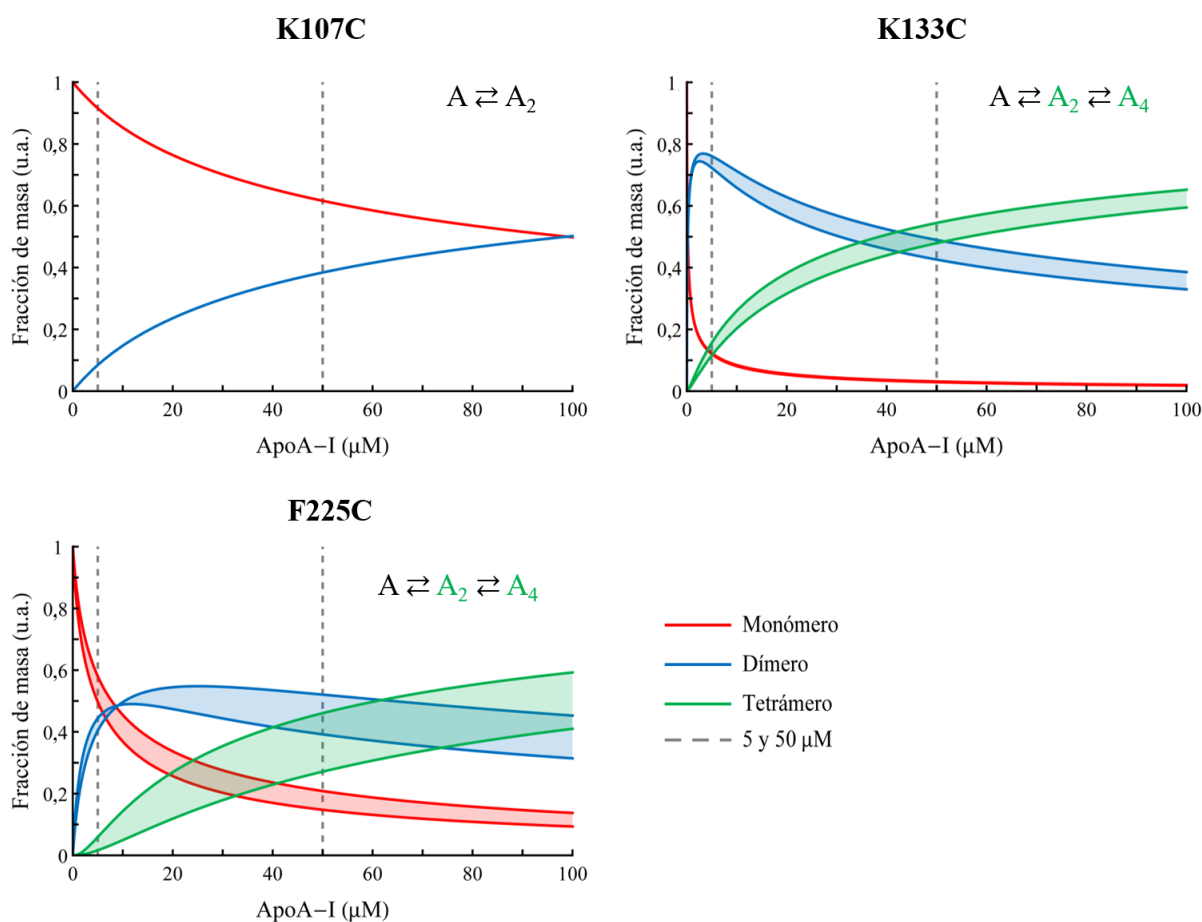
3) Finalmente, la **Tabla 2.13** y la **Figura 2.21** muestran que con el sub-modelo M1\_A4E2 la variante K133C-NPM reportó una  $K_{A1}$  mayor que la observada con F225C-NPM, indicando que la asociación por la posición 133 ocurre antes que por 225. Aun así, no podemos determinar con precisión si esta asociación tiene lugar en forma conjunta o independiente. Sería interesante evaluar si la incorporación de la sonda fluorescente en la posición 133 (una posición hidrofílica) alteró los equilibrios de asociación en esta variante, lo que podría explicar estos valores altos en la determinación del  $K_{A1}$ .



**Tabla 2.13: Constantes de asociación calculadas para un modelo de equilibrios múltiples**

Hélice	Posición	Modelo	Esquema	$K_{A1}/\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{mon}}$	$K_{A2}/\mu\text{M}_{\text{tet}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{dim}}$	$K_{A3}/\mu\text{M}_{\text{oct}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{tet}}$
H4	107	M1_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,010 \pm 0,001$	(n.a.)	(n.a.)
H5	133	M1_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$5 \pm 3$	$0,05 \pm 0,01$	(n.a.)
H10	225	M1_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$0,15 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	(n.a.)

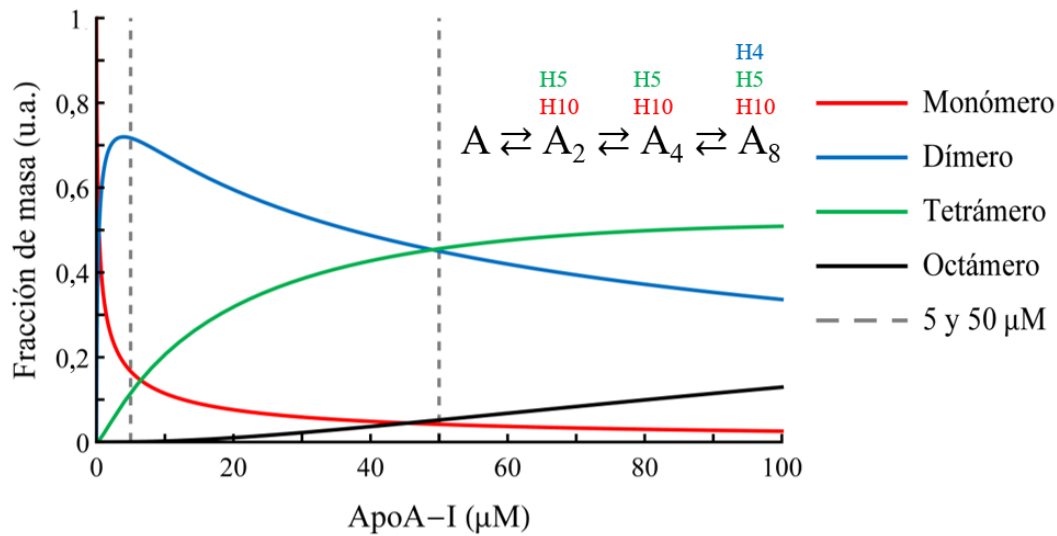
Los valores de  $K_A$  son presentados como promedios  $\pm$  errores estándar entre preparaciones independientes de proteínas (purificación y marcación): K107C (3), K133C (3) y F225C (3). Estos valores son obtenidos para un modelo de asociación secuencial progresiva (M1). En cursiva se resaltan aquellos valores de  $K_A$  que, en al menos una de sus repeticiones, iguala la cota superior que actúa como restricción (inversa del valor mínimo o máximo de concentración). (n.a.), no aplicable.



**Figura 2.21: Distribución de especies.** Distribución de especies calculadas en base a los valores de  $K_A$  presentados en la **Tabla 2.13**. Código de color: monómero (A, rojo), dímero ( $A_2$ , azul) y tetrámero ( $A_4$ , verde). Como referencias, se incluyeron las concentraciones aproximadas de apoA-I libre de lípidos y total en plasma (5 y 50  $\mu\text{M}$ , líneas discontinuas en gris). Cada distribución de especie se representa con dos líneas en base al error estándar, a excepción del valor de  $K_A$  con K107C-NPM y del primer equilibrio con K133C-NPM, donde no se pudieron determinar con precisión sus valores de  $K_A$  en cada uno. En cada gráfico se muestra el esquema de asociación de cada sub-modelo, donde las especies coloreadas en verde indican que se encuentran formando excímeros.

En resumen, en esta sección logramos desarrollar un método para analizar la auto-asociación de apoA-I, aprovechando las propiedades multiparamétricas de la sonda fluorescente pireno. Se desarrollaron y analizaron distintos modelos de asociación múltiple, logrando seleccionar lo que suponemos sería el mejor esquema que describe la auto-asociación de apoA-I (esquema M1,  $A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$ ) y obtener valores de  $K_A$  que describen los equilibrios observados con las variantes mutantes de apoA-I marcadas con pireno (K107C, K133C y F225C). En función de estos valores de  $K_A$ , hemos propuesto una distribución de especies que es la esperada para la auto-asociación de apoA-I en solución (**Figura 2.22**). Se agruparon los valores de  $K_A$ , presentados en la **Tabla 2.13**, en un primer equilibrio dirigido por auto-asociación en las hélices H5 y H10 con valores de  $5 \pm 3$  y  $0,15 \pm 0,03 \mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{mon}}$ ; un segundo equilibrio con la participación de las mismas hélices de  $0,05 \pm 0,01$  y  $0,04 \pm 0,02 \mu\text{M}_{\text{tet}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{dim}}$ ; y un tercero con la hélice H4 de  $0,010 \pm 0,001 \mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{mon}}$ , en esta última, el equilibrio se registra por cambios de polaridad. En esta distribución, apoA-I existe predominantemente en forma de dímero a  $5 \mu\text{M}$ , mientras que a  $50 \mu\text{M}$  las especies dominantes son el dímero y el tetrámero en conjunto. Esta temprana asociación, en particular con la hélice H5 sugiere que la especie funcional en plasma es la forma dimérica de apoA-I. Cabe recalcar que nuestros resultados no pueden discernir si el dímero se forma por asociación conjunta de las hélices H5 y H10, o en forma independiente una de la otra. La siguiente sección tratará de resolver este problema a través de una aproximación *in silico* que complementarán los resultados presentados en esta sección.

### Auto-asociación de apoA-I



**Figura 2.22: Auto-asociación de apoA-I.** Distribución de especies esperada en apoA-I. Código de color: monómero (A, rojo), dímero (A<sub>2</sub>, azul), tetrámero (A<sub>4</sub>, verde) y octámero (A<sub>8</sub>, negro). Como referencias, se incluyeron las concentraciones aproximadas de apoA-I libre de lípidos y total en plasma (5 y 50 μM, líneas discontinuas en gris). Los valores de  $K_A$  para obtener la distribución de especies fueron: ( $K_{A1}$ ,  $2,6 \mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{mon}}$ ), ( $K_{A2}$ ,  $0,045 \mu\text{M}_{\text{tet}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{dim}}$ ) y ( $K_{A3}$ ,  $0,010 \mu\text{M}_{\text{oct}} \cdot \mu\text{M}^{-2}_{\text{tet}}$ ). En la figura se agrega el esquema de asociación M1,  $A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$ , donde se resaltan la participación de las hélices H4 (azul), H5 (verde) y H10 (rojo) en auto-asociación, a excepción de H4.

### 2.6.3 Predicción de oligómeros por métodos computacionales

En la sección anterior surgió el problema de determinar si la auto-asociación por H5 o H10 tienen lugar en forma conjunta o independiente. En esta sección tratamos de resolver este problema a través de la obtención de modelos moleculares de las especies oligoméricas (dímero, tetrámero y octámero), con el objetivo de obtener información adicional y complementaria acerca de la disposición espacial de unidades moleculares de apoA-I en estos oligómeros. Estos modelos son generados por *docking* molecular utilizando distintos servidores online disponibles, esperando obtener así modelos de estas especies que apoyen los resultados presentados en las anteriores secciones.

Para generar estos modelos, se utilizó la estructura consenso propuesta por Melchior *et al.* 2017 [40] para el monómero de apoA-I. Luego, utilizando diferentes servidores

online: PatchDock y SymmDock [142], GRAMM-X [143], pyDock [144], SwarmDock [145], FroDock [146], HawkDock [147] y HDOCK [148], se simuló el *docking* entre dos unidades de monómero para generar el dímero. La evaluación del *docking*, y en consecuencia del modelo de dímero, fue llevada a cabo calculando las distancias moleculares entre los carbonos  $\alpha$  de los residuos de las posiciones utilizadas en esta Tesis, a excepción de 244 (en la mutante +244C), donde se utilizó la posición 243 en forma equivalente. Prestamos atención a las posiciones 133, 225 y 226 que deberían ser cercanas y, adicionalmente, la orientación entre sus dos monómeros, que sería relevante ya que las rHDL se sintetizan como un dímero de apoA-I y con una orientación antiparalela entre sus unidades (**Tabla 2.14**). Una vez seleccionado el mejor método de *docking*, los modelos del tetrámero y octámero fueron generados a partir del dímero considerando una asociación secuencial progresiva (M1). Finalmente, la evaluación de estos últimos modelos se realizó calculando las distancias mínimas entre los residuos seleccionados en esta Tesis, observando la ganancia en proximidad cuando se forman oligómeros de mayor tamaño (**Tabla 2.15**).

**Tabla 2.14: Distancias calculadas en dímeros obtenidos por *docking* molecular**

Posición <sup>a</sup>	PatchDock	SymmDock <sup>b</sup>	GRAMM-X	pyDock	SwarmDock	FroDock	HawkDock	HDOCK
104	33	33	25	40	35	41	52	58
107	39	35	24	41	35	43	51	54
133	71	12	38	39	42	35	25	19
137	84	14	41	52	51	49	30	15
225	11	27	46	45	60	41	74	82
226	18	20	46	38	60	34	68	76
243	34	9	51	23	60	18	58	66
<b>Configuración</b>	No determinada	Paralela	Paralela	Antiparalela	Antiparalela	Antiparalela	Antiparalela	Antiparalela

La tabla representa las distancias moleculares en angstrom (Å) entre carbonos  $\alpha$  de las posiciones 104, 107, 133, 137, 225, 226 y 243, para dímeros de apoA-I obtenidos por *docking* molecular. El modelo de monómero fue el propuesto por Melchior *et al.* 2017 [40] para la forma completa libre de lípidos. Se utiliza una escala de grises para distinguir tres rangos de distancias moleculares: < 20 Å (gris oscuro), entre 21 y 30 Å (gris claro) y > 31 Å sin color. Con cada modelo se determinó en forma visual si la orientación entre sus unidades corresponde a una orientación paralela o antiparalela; en caso de no poder determinarse, no se asignó ninguna orientación. (<sup>a</sup>) En color verde se resaltan aquellas posiciones que mostraron formación de excímero y por lo tanto proximidad entre sus residuos. (<sup>b</sup>) El servidor SymmDock realiza el *docking* molecular encontrando el mejor modelo por simétrica.

La **Tabla 2.14** muestra estos resultados, donde el modelo más atractivo es el obtenido utilizando el servidor HDOCK, con una distancia intermolecular de 19 Å entre los carbonos  $\alpha$  de la

posición 133 que apoya nuestros resultados de asociación con la variante mutante K133C-NPM (a su vez, las posiciones 225, 226 y 243 no reportaron proximidad). Además, este modelo presenta una orientación antiparalela entre sus monómeros, que como se mencionó podría ser relevante para mantener la configuración LL5/5 en rHDL. Es así que, utilizando este único modelo de dímero, se construyeron los modelos del tetrámero y octámero de apoA-I. La **Tabla 2.15** muestra las distancias mínimas entre los residuos seleccionados, donde con el modelo de tetrámero no se observaron distancias menores a 20 Å entre las posiciones que reportan formación excímeros en la hélice H10 (posiciones 225 y 226), pero sí una ganancia significativa en proximidad (ganancia de 43 y 36 Å, respectivamente), que podría sugerir un acercamiento intermolecular entre estas posiciones en solución acuosa (y permitir la formación de excímeros). Finalmente, estas ganancias en proximidad se observaron en el modelo del octámero, pero por formación del tetrámero. Además este modelo muestra regiones pobremente asociadas lo que sugirió que no era representativo de la estructura oligomérica (modelo no considerado). En conclusión, en base al análisis de proximidad entre posiciones aminoacídicas, los modelos del dímero y tetrámero de apoA-I podrían apoyar nuestras observaciones experimentales presentadas en la sección previa, indicando una asociación intermolecular a través de la posición 133 en un dímero y luego por 225 y 226 en un tetrámero.

**Tabla 2.15: Distancias mínimas predichas en oligómeros**

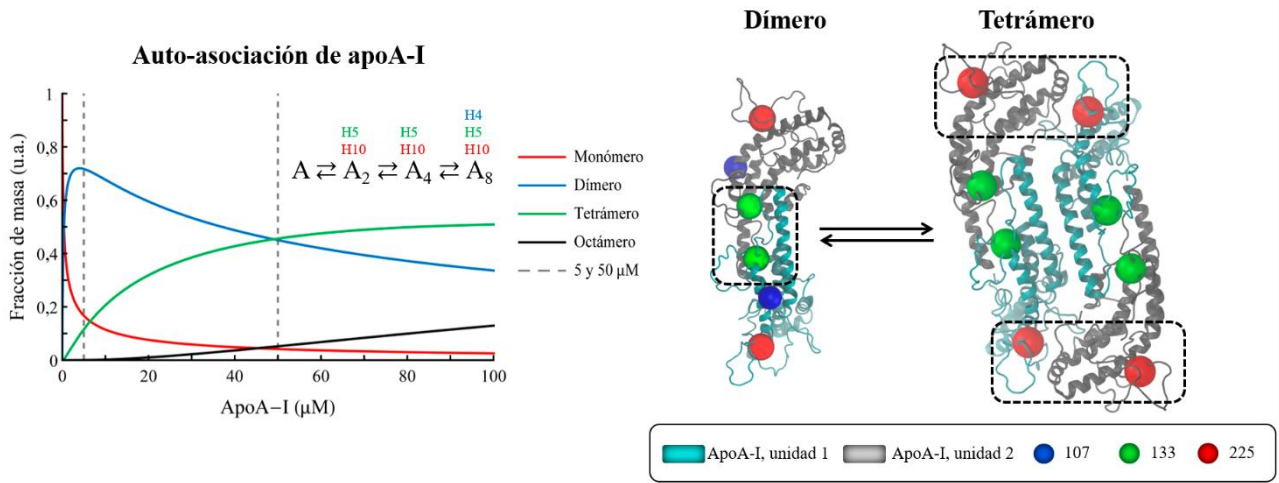
Posición <sup>a</sup>	Dímero	Tetrámero <sup>b</sup>	Octámero <sup>b</sup>
104	58	39 (19)	45 (13)
107	54	42 (12)	51 (3)
133	19	33 (-14)	54 (-35)
137	15	31 (-16)	57 (-42)
225	82	39 (43)	41 (41)
226	76	40 (36)	45 (31)
243	66	44 (22)	56 (10)

La tabla representa las distancias moleculares en angstrom (Å) entre carbonos  $\alpha$  de las posiciones 104, 107, 133, 137, 225, 226 y 243, para el modelo de dímero y las distancias mínimas en los modelos del tetrámero y octámero de apoA-I obtenidos por *docking* molecular. Cada uno de los modelos fue generado utilizando el servidor HDOCK considerando una asociación secuencial (M1). Se asigna una escala de color para distinguir las distancias moleculares: < 20 Å (gris oscuro) y > 21 Å sin color. <sup>(a)</sup> En color verde se resaltan aquellas posiciones que mostraron formación de excímero y por lo tanto proximidad entre estas posiciones. <sup>(b)</sup> En los modelos del tetrámero y octámero se representan entre paréntesis las ganancias en proximidad con respecto al dímero (un valor positivo indica un acercamiento y uno negativo un alejamiento).

## 2.6.4 Conclusión

En conclusión, a través del desarrollo y empleo de un análisis con modelos de asociación múltiple aprovechando las propiedades multiparamétricas de la sonda pireno, hemos podido describir distintos eventos de asociación en apoA-I. En general, el mejor esquema de asociación que describe nuestros datos corresponde a una asociación secuencial progresiva (M1). Con este esquema pudimos distinguir tres equilibrios de asociación distintos con las mutantes K107C, K133C y F225C, donde las dos últimas describen los primeros equilibrios ( $A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$ ), mientras que K107C el último ( $A_4 \rightleftharpoons A_8$ ). Luego para poder discernir qué asociación se lleva a cabo en primer lugar (por K133 o F225), obtuvimos modelos moleculares de las distintas especies oligoméricas por *docking* molecular y así complementar nuestros resultados. Estos modelos sugieren una asociación por la posición 133 en un dímero y probablemente por 225 y 226 en un tetrámero. La **Figura 2.23** resume estas observaciones, donde además proponemos que el dímero es posiblemente la especie funcional y predominante a concentraciones fisiológicas de apoA-I (dímeros en configuración antiparalela entre sus hélices H5). Con estos resultados, y en particular los modelos moleculares obtenidos, más estudios son necesarios para validar estas estructuras, como por ejemplo dinámica molecular. Los modelos de inicio, y posterior al *docking*, deben ser estabilizados energéticamente, según los estudios realizados por *Zhang et al.* 2015 [44], de esta manera permitiéndonos evaluar cambios de conformación que permitan mejorar las orientaciones y proximidades entre los residuos evaluados en esta Tesis y los observados de forma indirecta por otras metodologías (**Tabla 1.3**, ver en la Introducción). Además, sería crucial reproducir nuestros resultados de asociación en las hélices H5 y H10 por otras técnicas. Actualmente, se ha mostrado que la variante mutante  $\Delta W$  (mutante de apoA-I sobre el cual se reemplazaron todos sus residuos de Trp por Phe) permite poder aislar las distintas especies oligoméricas. La generación de mutantes de Cys (en particular K133C y F225C y K226C y/u otras) y marcación con pireno sobre esta variante mutante  $\Delta W$  permitiría aislar cada una de sus

especies oligoméricas y medir la fluorescencia de excímero en cada una de ellas, de esta manera, determinado efectivamente las asociaciones observadas en esta sección.



**Figura 2.23: Auto-asociación de apoA-I.** Se muestra la distribución de especies esperada en apoA-I. Código de color: monómero (A, rojo), dímero (A<sub>2</sub>, azul), tetrámero (A<sub>4</sub>, verde), octámero (A<sub>8</sub>, negro) y los modelos moleculares obtenidos por *docking* molecular para el dímero y tetrámero de apoA-I. En este último, se resaltan con color las posiciones más relevantes: 107, 133 y 225, y con un recuadro de puntos se ubican las posiciones potenciales en mostrar proximidad que dan origen a la fluorescencia de excímero en mutantes de apoA-I marcadas con pireno. Código de color: unidad 1 (cian), unidad 2 (gris), 107 (azul), 133 (verde) y 225 (rojo).

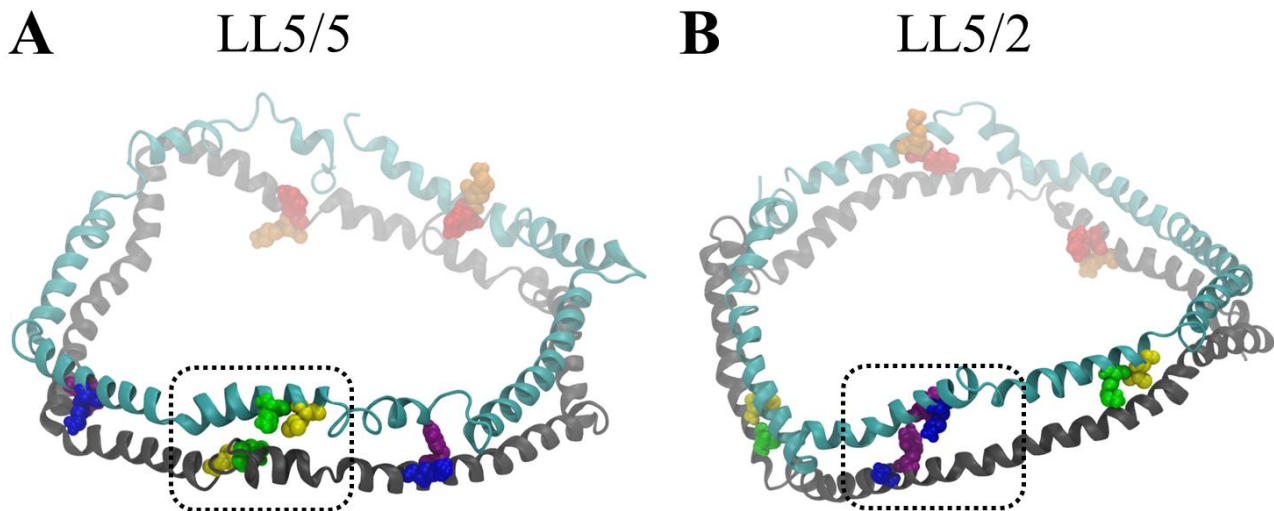
## 2.7 Interacción con membranas biológicas

### 2.7.1 Objetivos

En las secciones anteriores se abordó el estudio de apoA-I en solución, prestando atención a sus múltiples eventos de auto-asociación. Pero, como se ha resaltado en la introducción, apoA-I también se asocia con lípidos para formar estructuras macromoleculares conocidas como HDL. Con el objetivo de conocer cuál es la relevancia de las posiciones estudiadas en esta Tesis se utilizaron las variantes de Cys de apoA-I marcadas con pireno en estudios de interacción y asociación con lípidos. Los procesos para evaluar fueron los siguientes:

- 1) **Asociación con modelos de membranas.** Como se ha explicado, apoA-I se asocia con membranas lipídicas por un mecanismo de dos etapas (**Figura 1.5**, ver en la Introducción). Además, se conoce experimentalmente que apoA-I dimeriza en membrana [149], y que genera dHDL cuya composición es de al menos 2 unidades moleculares de apoA-I. De esta manera, decidimos evaluar si las posiciones seleccionadas en esta Tesis (localizadas en las hélices H4, H5 y H10) pueden evidenciar dichos eventos de asociación.
- 2) **Arreglos en rHDL generadas *in vitro*.** Como se detalló en la **Sección 2.1**, las posiciones seleccionadas en esta Tesis fueron escogidas en base a su capacidad de distinguir distintos arreglos de hélices en rHDL reconstituidas con variantes de apoA-I marcadas con sondas fluorescentes. En experimentos previos se demostró que la configuración LL5/5 (registrada con la variante K133C-Alexa) es predominante por reconstitución por diálisis con colato, mientras que la LL5/2 (registrada con la variante K107C-Alexa) lo es por microsolubilización directa. En la **Figura 2.24**, se representan estos modelos generados por MD por la Lic. Soledad Lynn como parte de los trabajos en relación a su Tesis Doctoral. De esta manera, nos propusimos evaluar si nuestros resultados con mutantes de apoA-I marcadas con pireno son apoyados por estos modelos.





**Figura 2.24: Modelos de rHDL LL5/5 y LL5/2.** A) registro LL5/5. B) registro LL5/2. Código de color: unidad 1 (cian), unidad 2 (gris), posición 104 (violeta), posición 107 (azul), posición 133 (verde), posición 137 (amarillo), posición 225 (rojo) y posición 226 (naranja). Con un recuadro en línea de puntos se resaltan las posiciones que se encuentran potencialmente próximas en estas dos configuraciones.

3) **Arreglos en dHDL generadas “*in vivo*”.** Debido a que varias de las mutantes de Cys de apoA-I fueron estructural y funcionalmente equivalentes a la proteína salvaje (apoA-I WT), decidimos evaluar la capacidad de cada una de estas de formar dHDL “*in vivo*”, utilizando modelos de macrófagos de la línea celular THP-1. Estos ensayos nos proporcionarán información sobre la relación entre las configuraciones de rHDL que observamos *in vitro* con las que ocurren en un entorno celular, de esta manera validando las rHDL como modelo de dHDL.

### 2.7.2 Interacción con membrana SUV

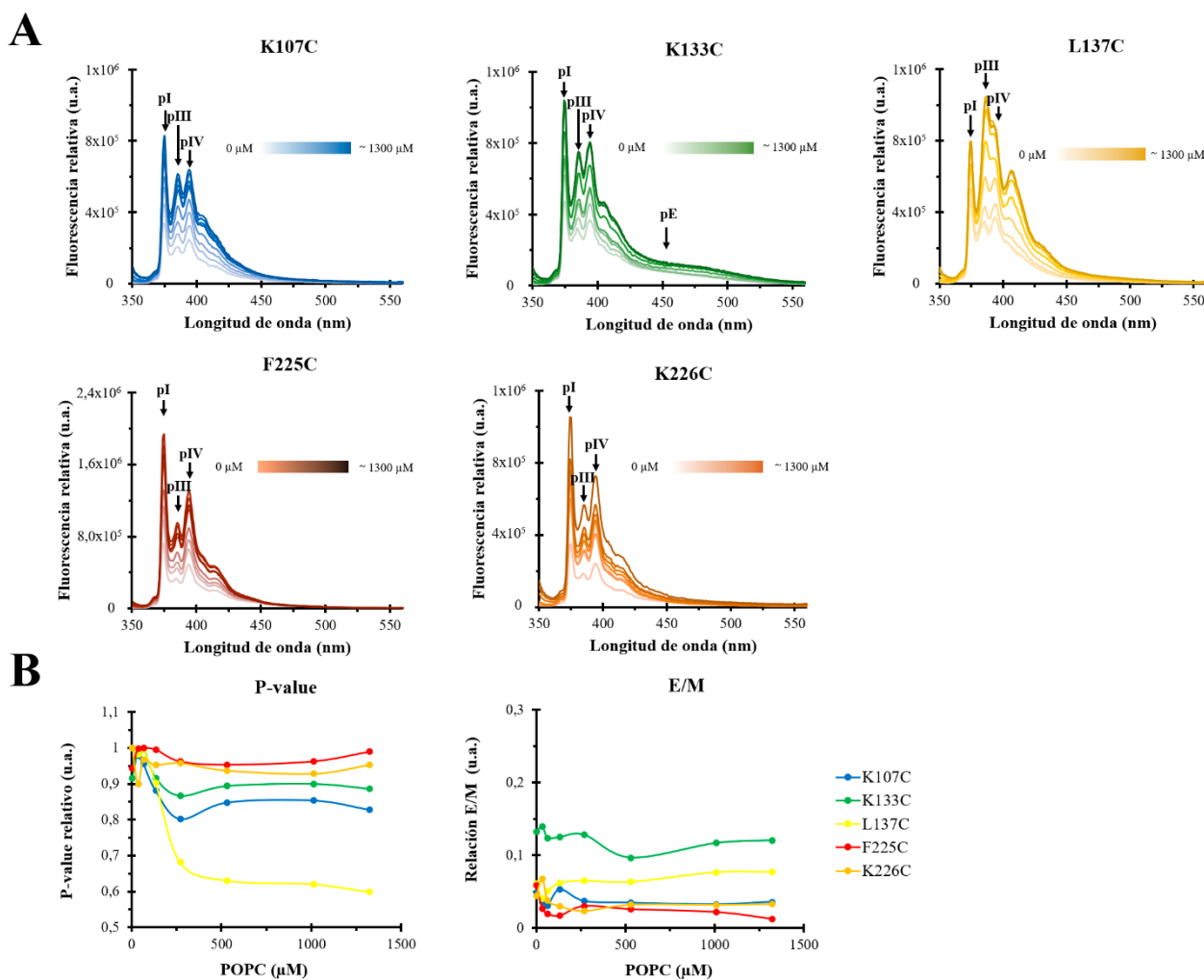
En la **Sección 2.4** se estudió la auto-asociación de apoA-I en solución acuosa, donde se observó una auto-asociación de las hélices H5 y H10. Por otro lado, como está descrito en la introducción (ver **Sección 1.4.3**) se conoce que apoA-I se auto-asocia en las hélices H4 y H5 en rHDL de configuración LL5/5 y LL5/2 (o LL4/4). Teniendo en cuenta estas dos observaciones en distintos estados de asociación (en solución y en membrana), nos propusimos como primer objetivo en esta sección conocer si existe una relación entre estos dos procesos, en particular en las hélices

H4, H5 y H10, a través de las propiedades de emisión de fluorescencia de mutantes de Cys de apoA-I marcadas con pireno. Como primera aproximación en este estudio, se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas (SUV) como modelo de membrana de diámetro  $\sim 50$  nm, obtenidas por sonicación, según el protocolo de obtención de estas vesículas (ver **Sección 4.1.10**), compuesta de POPC, un fosfolípido natural encontrado en membranas biológicas. Este modelo es ampliamente utilizado en el estudio de este sistema (apoA-I en asociación con membranas), donde la curvatura de estas vesículas influye en las propiedades de unión de apoA-I [150], observándose una mayor unión a vesículas de 20 nm cuando se compara con vesículas de 200 nm de diámetro, respectivamente. Se utilizaron las variantes K107C, K133C, L137C, F225C y K226C, a excepción de F104C y +244C, donde la primera no se comportó en forma equivalente a la apoA-I WT en solución, y la segunda no se encontraba disponible durante los ensayos realizados. De esta manera, se espera que los cambios en las propiedades fluorescentes del pireno nos permitan registrar eventos de asociación con membranas a través de la formación de excímeros en las posiciones seleccionadas que corresponden a las hélices H4, H5 y H10.

Los experimentos se llevaron a cabo con proteínas previamente dializadas y equilibradas, para eliminar las sales del medio y desarmar los oligómeros preexistentes. Se utilizó una concentración de proteína de 0,025 mg/ml (0,9  $\mu$ M) en buffer PBS a pH 7,4 [151]. Como primera aproximación, los ensayos se realizaron por titulación de apoA-I-NPM en cubeta de cuarzo a 25 °C, agregando alícuotas de solución *stock* de SUV de POPC. Entre cada agregado se esperó entre 10 y 15 min para que el sistema alcanzará al equilibrio, y luego se midieron espectros de emisión de fluorescencia excitando a 345 nm y recogiendo la emisión entre 350 y 560 nm. Luego estos espectros fueron corregidos por el *scattering* de las vesículas SUV en ausencia de proteína (**Figura 2.25 A**). Finalmente, utilizando la metodología de deconvolución espectral, presentada en la **Sección 2.5.3**, se obtuvieron el P-value y la relación E/M, ajustando cada espectro, de cada mutante, a una combinación de 6 distribuciones (pI, pIII, pIV, p6, p7 y pE, este último como señal residual a

460 nm) (**Figura 2.25 B**). Cabe aclarar que esta cantidad de distribuciones fue utilizada para asignar una señal mínima a la emisión de fluorescencia del excímero y así poder calcular la relación E/M.

La **Figura 2.25 A** muestra estos espectros, obtenidos para un set de titulaciones con concentraciones crecientes de POPC. Se observa un incremento en la fluorescencia total del pireno en todas las variantes mutantes que podrían estar asociadas a una interacción entre apoA-I y las vesículas SUV. Por otro lado, estos espectros no muestran cambios significativos en proximidad entre las posiciones seleccionadas a través de la formación de excímeros, pero sí disminuciones en polaridad registradas por la señal de P-value, en algunas de las mutantes evaluadas, en particular en la posición 137 (**Figura 2.25 B**). Estos cambios en el incremento del rendimiento cuántico del pireno y de polaridad por P-value pueden asociarse a una interacción con la membrana fosfolipídica de POPC seguido de un desplegamiento de la proteína tal como se explica en el modelo de dos etapas propuesto por *Saito et al.* 2003 [59], o de un cambio de conformación del dímero coordinada a la interacción con la membrana. Por otro lado, si nos enfocamos en la señal de excímeros, observamos que, en las condiciones trabajadas, K133C presentó una relación E/M mayor que en el resto de las mutantes, existiendo esta mutante probablemente en su forma dimérica en solución (**Figura 2.25 A**).



**Figura 2.25: ApoA-I vs SUV.** Fluorescencia en mutantes de apoA-I marcadas con pireno en interacción con SUV. A) Espectros de emisión de fluorescencia para las distintas mutantes. Para apreciar los cambios, los espectros se relativizan por su intensidad total. Las intensidades más relevantes se encuentran resaltadas con flechas: 375 nm (pI), 385 nm (pIII), 395 nm (pIV) y excímero (pE). B) P-value relativo al valor de P-value a concentración cero de POPC, y relación E/M a partir de espectros deconvolucionados con 6 distribuciones (pI, pIII, pIV, p6, p7 y pE, este último como señal residual a 460 nm, para de esta manera calcular la relación E/M). Código de color: K107C (azul), K133C (verde), L137C (amarillo), F225C (rojo) y K226C (naranja).

En conclusión, los resultados previamente descritos mostraron que apoA-I interacciona con membranas lipídicas posiblemente sufriendo cambios conformacionales durante el proceso. Aunque las posiciones seleccionadas en el estudio no reportaron eventos de auto-asociación, lo que nos estaría sugiriendo que los registros LL5/5 y LL5/2 no se forman por asociación en membranas, al menos por interacción directa entre las posiciones seleccionadas marcadas con la sonda pireno. Por

otro lado, pareciera que el dímero con K133C-NPM observado a la concentración del experimento no se disocia cuando esta se asocia con membranas fosfolipídicas.

### 2.7.3 Reconstitución de rHDL con mutantes de apoA-I marcadas con pireno

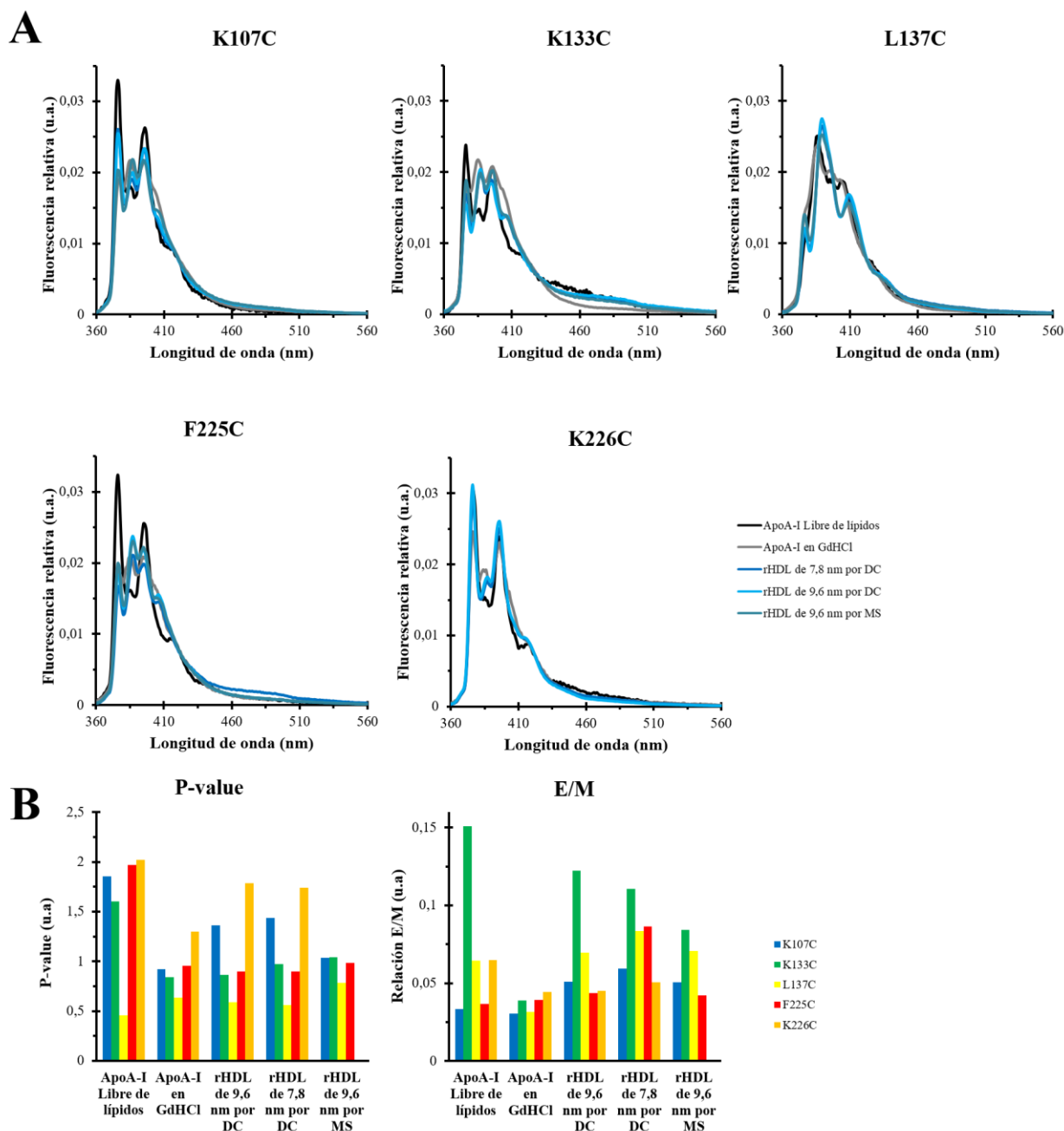
El proceso de asociación de apoA-I con membranas fosfolipídicas es el paso previo que necesita apoA-I para formar partículas de dHDL. Se conoce relativamente poco acerca de si los procesos de asociación en solución y en membrana determinan la o las configuraciones observadas en rHDL. Es así que en esta sección nos propusimos evaluar si las hélices H4, H5 y H10, previamente estudiadas en solución y en asociación con membranas lipídicas, reportan asociación a través de las propiedades de emisión de fluorescencia en mutantes de Cys de apoA-I marcadas con pireno. Se conoce que la generación espontánea de rHDL por asociación con membranas fosfolipídicas es muy lenta, de esta manera, es necesario facilitar este proceso por diferentes metodologías. En esta sección se eligieron dos: la reconstitución por diálisis con colato y la microsolubilización directa a la temperatura de transición de fase del lípido DMPC (24°C). La primera genera, preferentemente, partículas de configuración LL5/5, mientras que la segunda de configuración LL5/2, según *Cuellar et al.* 2014 [129] con las variantes K107C (H4), K133C (H5) y K226C (H10), donde la última actuó como control negativo. En esta sección, se utilizaron las variantes generadas por *Cuellar et al.* 2014 y las generadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral, a excepción de +244C que no se encontraba disponible durante los experimentos. La variante K107C sería útil en reportar la configuración LL5/2; las variantes K133C y L137C reportarían la configuración LL5/5; y las variantes F225C y K226C actuarían como controles negativos, no observándose proximidad entre estos residuos por formación de excímeros. De esta manera, con estas mutantes, se espera distinguir entre las configuraciones LL5/5 y LL5/2 a través de la formación de excímeros, lo que indicaría una proximidad  $< 10 \text{ \AA}$  entre las posiciones seleccionadas en el estudio, y la capacidad de utilizar estas mutantes en experimentos “*in vivo*” con células en cultivo.

Se evaluaron los cambios espectrales de la sonda fluorescente pireno con las variantes K107C, K133C, L137C, F225C y K226C, en rHDL reconstituidas por diálisis con colato y microsolubilización directa. Las rHDL fueron generadas como se describe en detalle en las **Secciones 2.3.5 y 2.3.6**. Luego se midieron espectros de fluorescencia excitando a 345 nm y recogiendo la emisión entre 360 y 560 nm en buffer TBS (30 mM Tris y 150 mM NaCl a pH 7,4) a 25°C. Luego estos espectros fueron corregidos por la emisión del buffer y normalizados por su fluorescencia total, para de esta manera apreciar los cambios en la estructura de fluorescencia del pireno, en especial la emisión de excímero. La **Figura 2.26 A** muestra estos resultados para las partículas de rHDL de tamaños 7,8 y 9,6 nm generadas por diálisis con colato y de 9,6 nm generada por microsolubilización directa, en este último no se incluyó la variante K226C por que no se encontraba disponible durante los ensayos. Los cambios relativos de los espectros fueron comparados con las mismas variantes en solución y en GdHCl. Luego haciendo uso de la metodología de deconvolución espectral, puesta a punto en este trabajo de Tesis Doctoral y presentado en la **Sección 2.5.3**, obtuvimos el P-value y la relación E/M (**Figura 2.26 B**), ajustando cada espectro de cada mutante a una suma de 6 distribuciones (pI, pIII, pIV, p6, p7 y pE, este último como señal residual a 460 nm). Cabe aclarar que esta cantidad de distribuciones fue utilizada para asignar una señal mínima a la emisión de fluorescencia del excímero y así poder calcular la relación E/M. Finalmente, para complementar nuestras observaciones, se compararon nuestros resultados con los modelos de rHDL propuestos por la Lic. Soledad Lynn (**Figura 2.24**).

Los resultados de fluorescencia del pireno en rHDL por diálisis con colato y microsolubilización directa muestran una ausencia de formación de excímero en la hélice H10 con las variantes F225C y K226C, que es coherente con el diseño de controles negativos. En los modelos de rHDL, la distancia (entre carbonos  $\alpha$ ) entre estas posiciones es de 30 y 33 Å en LL5/5; y 35 y 40 Å en LL5/2, de esta manera, estos modelos apoyan los datos de fluorescencia en la hélice H10.

Con respecto a la hélice H4 con la variante K107C, no se observó formación de excímero con las dos metodologías de reconstitución, en particular por microsolubilización directa, donde se esperaba proximidad entre las posiciones 107 de cada molécula en un dímero (en rHDL LL/5/2 la distancia es de 21 Å). Por otro lado, este resultado apoya el modelo LL5/5 con una distancia de 61 Å.

En cuanto a la hélice H5, la variante L137C, tampoco reportó formación de excímero, que es también apoyado con los modelos LL5/5 y LL5/2, con valores de 21 y de 78 Å, respectivamente. Aunque, con la variante K133C, observamos una reducida formación de excímero en rHDL, donde no se observa una diferencia sustancial entre las distintas metodologías de reconstitución y con apoA-I en buffer, aunque esta señal desaparece cuando la comparamos con proteína en GdHCl.



**Figura 2.26: rHDL generadas *in vitro*.** Espectros de emisión de fluorescencia en rHDL reconstituidas con mutantes de apoA-I marcadas con pireno. A) rHDL de ~7,8 y 9,6 nm reconstituidas por diálisis con colato (DC) y de ~9,6 nm por microsolvubilización directa (MS). Con cada mutante, para comparar los cambios relativos en la señal de P-value y la relación E/M, se agregó un espectro adquirido en buffer PBS (~5  $\mu$ M) y en buffer PBS + 3 M GdHCl (muestras a 100°C durante 5 min para desarmar los oligómeros presentes). Los espectros fueron relativizados por su fluorescencia total para apreciar los cambios relativos en sus espectros. B) P-value y relación E/M a partir de espectros deconvolucionados con una suma de 6 distribuciones (pI, pIII, pIV, p6, p7 y pE, este último como señal residual a 460 nm, para de esta manera calcular la relación E/M). Código de color: K107C (azul), K133C (verde), L137C (amarillo), F225C (rojo) y K226C (naranja).



En conclusión, nuestros resultados con la mutante K133C sugieren, aunque en una proporción baja, que las rHDL producidas en el laboratorio adquieren una configuración LL5/5. No obstante, las señales bajas de fluorescencia de excímero en esta configuración, ampliamente estudiada y detallada en bibliografía, (ver **Sección 1.4.4.2**) y la incapacidad de registrar la configuración LL5/2 con la variante K107C nos hace pensar que la sonda fluorescente pireno, localizada en estas posiciones hidrofílicas, podrían estar ocultándose del medio acuoso hacia entornos más hidrofóbicos y, de esta manera, explicar la reducida señal de excímero de pireno en ambas. Por otro lado, con respecto al método de reconstitución, se ha observado en bibliografía que ambas configuraciones (LL5/5 y LL5/2) son producidas en conjunto por diálisis con colato según *Cooke et al.* 2018 [152], y que la LL5/5 es predominante con respecto a la LL5/2. De esta manera, podemos establecer que estas dos configuraciones se encuentran en un equilibrio  $LL5/5 \rightleftharpoons LL5/2$  (que requiere menos de 4 hs a 37 °C para que se equilibren los monómeros de apoA-I entre rHDL según *Handa et al.* 2015 [153]), además del equilibrio que se observa entre apoA-I libre de lípidos y asociada a rHDL,  $apoA-I \rightleftharpoons rHDL$  [154]. Estas observaciones nos hacen pensar que quizá exista un recambio rápido entre estas dos configuraciones, que podrían estar equilibrando las rHDL hacia una configuración LL5/5 en lugar de una LL5/2. De esta manera, proponemos como perspectiva realizar cinéticas de microsolubilización directa siguiendo la emisión de fluorescencia del pireno entre 395 y 460 nm a tiempos cortos, entre 10 y 30 min (donde se lleva a cabo la totalidad del mencionado). Es así que podríamos revelar si la configuración LL5/2 se produce por microsolubilización directa con la variante K107C. A pesar de estas limitantes en las mutantes utilizadas, se decidió evaluar la capacidad de estas de ser reconstituidas por células en cultivo.

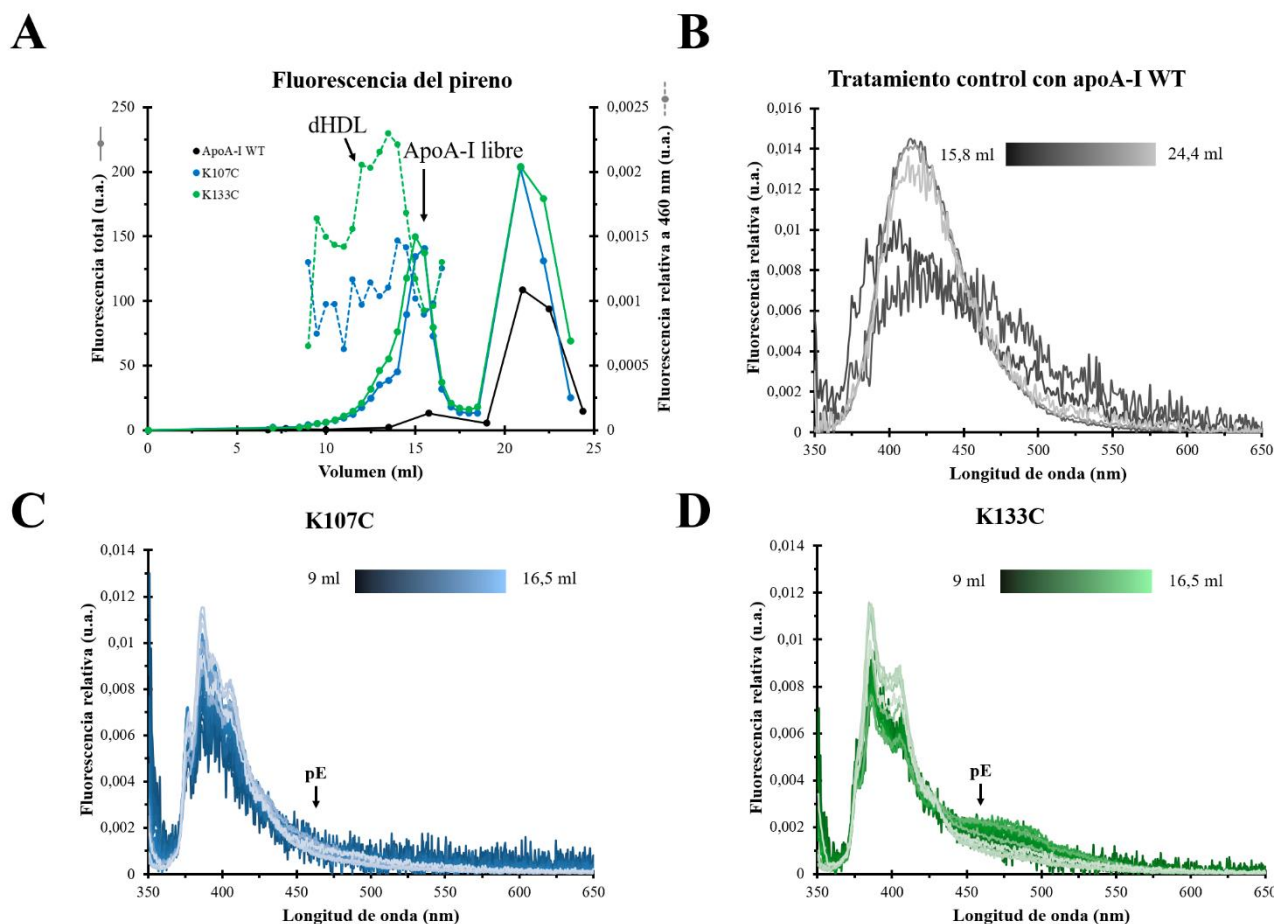
### 2.7.4 Reconstitución de dHDL en entornos celulares

En la sección anterior estudiamos las rHDL reconstituidas *in vitro* con variantes mutantes de apoA-I marcadas con pireno. Estos procesos de reconstitución simulan lo que sucede *in vivo* en la superficie de las membranas biológicas, donde apoA-I se asocia a segmentos de alta curvatura generados por acción de ABCA1, según lo reportado por *Vedhachalam et al.* 2017 [150]. En esta sección retomamos el estudio de rHDL, pero reconstituidas “*in vivo*” por células en cultivo de macrófagos. Estos experimentos tienen como objetivo complementar nuestros resultados obtenidos *in vitro* y de aquellos reportados por *Cuellar et al.* 2014 [129] con las variantes K107C, K133C y K226C [129]. Se utilizaron células en monocapa provenientes de una línea celular monocítica THP-1, que cuando se diferencian “*in vivo*” reproducen muchas de las características de las células macrofágicas. El tratamiento se realizó en forma preliminar en ausencia de bromo adenosín monofosfato cíclico (Br-cAMP), un derivado permeable del cAMP comúnmente utilizado en este tipo de ensayos, que activa las vías de señalización por PKA y que favorece la microsolubilización por apoA-I. Como aproximación preliminar, para evaluar la respuesta del sistema, se utilizaron únicamente las variantes K107C y K133C. De esta manera, se espera determinar cuál de las dos configuraciones LL5/2 o LL5/5 (o ambas) en dHDL es la que se ve favorecida en su producción “*in vivo*”.

El tratamiento consistió en una incubación durante 24 hs a 37 °C con las variantes K107C, K133C y apoA-I WT, esta última actuando como control de síntesis de dHDL. La concentración de proteína para realizar el tratamiento fue de 20 µg/ml (0,7 µM), conforme lo reportado por *Bielicki et al.* 1999 [155]. Luego, con cada variante, el medio fue colectado, concentrado y fraccionado por cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200). Después, a cada fracción se le midió el espectro de emisión de fluorescencia del pireno excitando a 345 nm y recogiendo la emisión entre 350 y 650 nm. La **Figura 2.27 A** muestra el perfil de elución obtenido, donde se siguió la ubicación de cada proteína marcada calculando su emisión total de fluorescencia. Además, se graficó

la señal de emisión de excímero como fluorescencia a 460 nm (espectros normalizados por su fluorescencia total) únicamente de aquellas fracciones con emisión característica de pireno (**Figuras 2.27 B y C**).

En la **Figura 2.27 A** se observa que la elusión de las proteínas marcadas ocurre entre las fracciones de 9 y 16,5 ml. En estas, la elusión máxima tiene lugar con la fracción de 15 ml, donde no se observa fluorescencia a 460 nm con las variantes K107C y K133C. Por otro lado, una elusión secundaria, en menor abundancia de señal de pireno, ocurre previa al pico de elución máxima. Es aquí donde se registra una emisión de fluorescencia a 460 nm diferente entre las variantes K107C y K133C, observándose una señal entre 450 y 500 nm que suponemos corresponde al excímero en esta última. Si realizamos una comparación entre nuestros perfiles de elusión con aquellos que siguen una marca radiactiva en apoA-I y en los fosfolípidos, observamos que estos son equivalentes [156–158]. En ese sentido, podemos suponer que la elución secundaria entre las fracciones 10 y 12,5 corresponde a dHDL reconstituidas “*in vivo*”. De esta manera, nuestro resultado preliminar muestra que las fracciones previas a la elusión máxima corresponden partículas de dHDL generadas por interacción con THP-1, en una configuración LL5/5, en lugar de una LL5/2.



**Figura 2.27: dHDL generadas “in vivo”.** Espectros de emisión de fluorescencia del perfil de separación de dHDL reconstituidas “in vivo” conteniendo apoA-I-NPM. A) Perfil cromatográfico seguido por fluorescencia total del pireno y a 460 nm relativa a la fluorescencia total (pE). En esta última, solo se muestra el valor de pE de aquellos espectros con fluorescencia típica de pireno y no de otras especies con fluorescencia distinta. B) Espectros de emisión de fluorescencia del tratamiento con apoA-I WT. C) y D) Espectros de emisión fluorescencia de las fracciones obtenidas entre 9 y 16,5 ml con las mutantes K107C y K133C marcadas con pireno, respectivamente. Los espectros de fluorescencia fueron relativizados por su fluorescencia total. Código de color: apoA-I WT (gris), K107C (azul) y K133C (verde).

En conclusión, con nuestro sistema de estudio de células en cultivo (THP-1) con apoA-I marcadas con pireno (K107C y K133C), logramos observar en forma preliminar lo que suponemos reconstitución de dHDL en una configuración LL5/5. A pesar de estos resultados, habría que seguir realizando más experimentos para corroborar nuestras observaciones. La presencia de colorantes y componentes fluorescentes en la muestra dificultan seguir la elución de nuestras proteínas de interés y la correcta interpretación de nuestros resultados por emisión de fluorescencia. Esto podría resolverse utilizando medios de cultivo que no presenten estos componentes. Por otro lado, la

población de partículas de dHDL también podría incrementarse realizando incubaciones con proteína marcada en células en cultivo previamente estimuladas con Br-cAMP, análogo de cAMP que promueve la remoción del colesterol. También, la inclusión de la variante +244C determinaría fielmente la ausencia de la señal de excímero. Además, quizás sea necesario el diseño de nuevas variantes mutantes que permitan registrar el arreglo LL5/2 *in vitro* y luego “*in vivo*”. Finalmente, si realizamos *western-blot* sobre estas partículas en NATIVE-PAGE 4-25 % seguido de microscopía de transmisión electrónica, estos resultados nos proporcionarían una confirmación del tamaño de estas y si efectivamente son dHDL. De esta manera, todos estos resultados nos permitirán finalmente caracterizar la o las configuraciones de apoA-I en rHDL producidas “*in vivo*”.

### 2.7.5 Conclusión

En conclusión, los resultados presentados a lo largo de esta sección, en base a los experimentos de interacción con membranas fosfolipídicas y la reconstitución *in vitro* de rHDL como “*in vivo*” de dHDL, nos han proporcionado información con respecto a las posibles configuraciones que podría adquirir apoA-I en rHDL/dHDL. Primero, las hélices estudiadas (H4, H5 y H10), no parecen reportar una auto-asociación con membranas modelos de SUV, en las posiciones evaluadas. Segundo, observamos una auto-asociación con lípidos en rHDL y dHDL, donde la configuración LL5/5 parece ser la predominante. Por último, no hay información suficiente que nos indique que exista una reconstitución preferencial hacia una configuración LL5/5 o LL5/2 por diálisis con colato y microsolutibilización directa. Creemos que estas discrepancias, en particular a la señal de fluorescencia de excímero en rHDL, podrían ser explicadas por arreglos sub-óptimos entre las posiciones con residuos marcados con pireno, que son distintas cuando apoA-I se encuentra en solución y en asociación con lípidos. Además, el equilibrio rápido entre las distintas configuraciones (LL5/5 y LL5/2) luego de generar las partículas de rHDL, pueden estar equilibrando nuestras muestras hacia una configuración LL5/5 en lugar de una LL5/2. En resumen, estos primeros

## RESULTADOS

---

resultados, sumado a lo reportado en solución acuosa, nos lleva a plantear que un dímero con H5 auto-asociada es posiblemente la especie funcional de apoA-I que permite los arreglos LL5/5 observados en rHDL y dHDL.

# **Capítulo 3:**

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Esta página se encuentra en blanco



En este trabajo se han empleado mutantes de Cys de apoA-I marcados con la sonda fluorescente pireno para analizar eventos de asociación, interacción con membranas y asociaciones con lípidos en rHDL. En esencia, gracias a las propiedades multiparamétricas de la sonda y su sensibilidad al entorno, cada mutante reporta cambios conformacionales de la proteína de acuerdo a la localización de la sonda y relacionándolo a regiones específicas, en particular las hélices H4, H5 y H10, según la nomenclatura en rHDL. Las posiciones 107, 133 y 226 se eligieron como punto de partida sobre la base de resultados anteriores [129]. Las posiciones 107 y 133 fueron útiles en distinguir dos configuraciones de dímeros de apoA-I en rHDL, donde la posición 226 actuó como control negativo. Para complementar estas posiciones, se diseñaron tres nuevos mutantes en las mismas hélices, pero en sus caras hidrofóbicas (posiciones 104, 137 y 225). Y como las mutantes de la hélice H10 también reportaban cambios significativos de asociación en solución se incluyó una mutante extra, a modo de control negativo, a la que se le agregó una Cys C-terminal. De esta manera, la unión de la sonda fluorescente multiparamétrica pireno en estas posiciones nos permitió evaluar cambios de polaridad en su microentorno y la proximidad entre hélices en función de diferentes eventos y tipos de asociación, ya sea entre equilibrios de oligomerización, en la interacción con membranas fosfolipídicas o en lipoproteínas discoidales.

La estabilidad del plegamiento y la reconstitución de partículas de rHDL se utilizaron como controles estructurales y funcionales para evaluar el efecto de las mutaciones y de la marcación con pireno en estas variantes de apoA-I. Estos resultados demostraron que todas las mutantes se comportaron de forma similar a la apoA-I WT, excepto por F104C, que se excluyó de los estudios posteriores.

Nuestras variantes de Cys de apoA-I marcadas con pireno se utilizaron para estudiar la auto-asociación de apoA-I en solución. Estos primeros resultados nos permitieron registrar eventos de asociación de monómeros de apoA-I, en un rango de concentraciones que habitualmente inducen la formación de distintas especies oligoméricas conforme lo reportado por *Vitello et al.* 1976 [47] y

*Zehender et al.* 2012 [54]. Estos eventos de asociación fueron registrados con las variantes K133C, F225C y K226C indicando que estas posiciones estarían involucradas en regiones de contacto durante la oligomerización de apoA-I. Es así que nuestro sistema de estudio (apoA-I marcada con la sonda fluorescente pinero) nos permitió evaluar de manera sencilla un sistema complejo, como lo es la auto-asociación de apoA-I.

Como se mencionó, nuestros resultados mostraron una auto-asociación con las variantes F225C y K226C marcadas con pireno. Estos residuos se ubican en la región C-terminal y en la hélice H10 de apoA-I, conforme las nomenclaturas en solución acuosa (residuos 187-243) y en rHDL (residuos 220-243), respectivamente. La región C-terminal ha sido reportada, en forma directa e indirecta, de participar en las interacciones entre monómeros de apoA-I en solución acuosa. Por un lado, distintos autores observaron una auto-asociación en esta región: *Silva et al.* 2005 [41] registraron entrecruzamientos químicos entre las Lys (K226/K238)-K238; *Chetty et al.* 2009 [60] observaron reducción en el intercambio H-D en los fragmentos 212-222 y 233-243; y, finalmente, *Oda et al.* 2003 [38] y *Lagerstedt et al.* 2012 [140] observaron un acoplamiento dipolar con la mutante de K226C en estudios de EPR. Por otro lado, *Fuentes et al.* 2018 [58] observaron una reducción de la auto-asociación de apoA-I cuando se eliminan las cargas de los residuos que componen la región C-terminal con mutantes de sustitución de residuos K/E→G (residuos K206, K208, K238, K239, E234 y E235). Finalmente, *Horn et al.* 2017 [57] reportaron que cuando se transfiere la región 179-243 de apoA-I hacia apoLp-III, una apolipoproteína que no oligomeriza, la proteína quimera resultante muestra el mismo patrón de oligómeros observado en apoA-I. Por lo tanto, en base estas observaciones, presentadas por diferentes autores y nuestros resultados, podemos plantear que la región C-terminal participa y modula los eventos auto-asociación de apoA-I en solución acuosa con un patrón de asociación que es independiente de la presencia del resto de la proteína.

Retomando el resultado de auto-asociación con la variante K133C marcada con pireno, esta se ubica en la región central (residuos 60-183) y en la hélice H5 (residuos 121-142) de apoA-I, según las nomenclaturas en solución y en rHDL, respectivamente. Esta proximidad entre hélices H5 se ve apoyado por el modelo de dímero de apoA-I propuesto por *Mei et al.* 2011 [59], que se registró por difracción de rayos X en una mutante de eliminación de la región C-terminal de apoA-I (apoA-I  $\Delta$ 185-243). En este modelo, las hélices H5 se encuentran próximas entre sí con una distancia de 13 Å entre las posiciones 133 de cada monómero. Al mismo tiempo, esta mutante ha mostrado conservar su capacidad de asociación con un patrón que únicamente llega hasta el dímero, indicando que apoA-I conserva una capacidad remanente de asociación que contrasta con la auto-asociación completa inducida por la región C-terminal [59]. Aún más, si nos enfocamos en las rHDL, donde está bien documentado que estas estructuras están formadas por dos o más moléculas de apoA-I, encontramos que en el modelo de rHDL LL5/5, las hélices H5 se encuentran próximas entre sí, conforme lo reportado por *Cooke et al.* 2018 [152] con la variante K133C por oxidación y luego SDS-PAGE. Cabe recalcar que esta configuración es la necesaria para activar la LCAT y convertir el FC  $\rightarrow$  CE. Esta relación evidente entre la auto-asociación y la configuración en rHDL a través de posibles contactos entre las hélices H5 no es casual. Y es así que nosotros proponemos que uno de los posibles roles de la auto-asociación de apoA-I en solución es determinar esta orientación (además de otras), facilitando así la formación de la configuración LL5/5 observada en dímeros de apoA-I en rHDL.

Con las mutantes de apoA-I que mostraron una sensibilidad considerable a los cambios espectrales del pireno, inicialmente, caracterizamos la auto-asociación de apoA-I a partir de la obtención de constantes de asociación ( $K_A$ ) para modelos de equilibrio único, cuyos valores ( $K_A$ , 0,014-0,27  $\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$ ) se encuentran en el rango de aquellos publicados previamente usando otras técnicas ( $K_A$ , 0,13-0,76  $\mu\text{M}^{-1}$ ), tales como ITC, AUC y DLS [53]. Nuestros valores de  $K_A$  de equilibrio único nos permitieron caracterizar numéricamente los eventos de asociación

observados en apoA-I y discernir que al menos dos equilibrios están siendo observados en nuestros experimentos. El primer evento, de alta afinidad a través de la formación de excímeros a través del contacto entre las hélices H10 ( $K_A$ ,  $0,27 \pm 0,09 \mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$ ), mientras que el segundo evento de menor afinidad representado por cambios en los valores de P-value alrededor de las hélices H4 y H5 ( $K_A$ ,  $0,014 \pm 0,003 \mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$  y  $0,021 \pm 0,006 \mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$ , respectivamente).

La existencia de equilibrios múltiples que coexisten en el rango de concentración fisiológica en apoA-I y la posibilidad de la mutante K133C marcada con pireno para pensar al menos dos de esos equilibrios nos llevó a proponer una estrategia de análisis más compleja en base a modelos con más de un equilibrio y un número alternativo de especies con capacidad de formar excímeros. Se esperaba que estos representen mejor la naturaleza de auto-asociación en apoA-I. Es así que pudimos resolver más de un evento de asociación por ubicación de la sonda fluorescente en las hélices H5 y H10. Además, entre los 4 esquemas de asociación analizados, el modelo de asociación secuencial progresiva ( $A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$ ) emerge como aquel que mejor reproduce nuestros datos experimentales de auto-asociación de apoA-I. Por otro lado, nuestros valores de  $K_A$ , presentados en la **Tabla 3.1** en conjunto con aquellos publicados por otras metodologías, muestran una asociación temprana (valor promedio de  $K_A$   $1,26 \mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$ ), que presumimos corresponde a la especie dimérica, por debajo de la concentración de  $0,1 \text{ mg/ml}$  ( $3,5 \mu\text{M}$ ). Estos valores de  $K_A$ , junto con la presencia de una señal residual de excímero a concentraciones bajas de proteína, sugieren que la especie dimérica, con una auto-asociación en la hélice H5, es la primera especie en formarse a concentraciones fisiológicas de apoA-I. Al mismo tiempo, a concentraciones totales de proteína libre ( $50 \mu\text{M}$ ), las especies del dímero y tetrámero serían las predominantes. De esta manera, en base a nuestros resultados, propusimos distintos modelos tridimensionales generados por *docking* molecular que apoyan nuestras observaciones e indican que la forma activa y unidad funcional en el plasma podría corresponder a dímeros de apoA-I por asociación entre sus hélices H5.

**Tabla 3.1: Constantes de asociación reportadas en apoA-I**

Autor	Modelo	ApoA-I	Rango de concentración	Metodología	$K_A1$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$K_A2$ ( $\mu\text{M}^{-3}$ )	$K_A3$ ( $\mu\text{M}^{-5}$ )
<i>Vitello et al.</i> 1976 [47]	M2	Suero humano	30 $\mu\text{M}$ (20 °C)	AUC	0,03	$3 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-9}$
<i>Formisano et al.</i> 1978 [50]	M2	Suero humano	3,6-39,6 $\mu\text{M}$ (21 °C)	AUC	0,01	$4 \times 10^{-3}$	$8 \times 10^{-6}$
<i>Prieto et al.</i> 2011 [52] <sup>a</sup>	M3	Recombinante	0,4-3,6 $\mu\text{M}$ (25 °C)	Fluorescencia de Trp	4	(n.a.)	(n.a.)
	M4 <sup>b</sup>				3	(n.a.)	(n.a.)
	M4 <sup>b</sup>				3	(n.a.)	(n.a.)
<i>Zehender et al.</i> 2012 [54]	M3 <sup>c</sup>	Recombinante	1,6-160 $\mu\text{M}$ (21 °C)	ITC	0,6 (0,003) <sup>c</sup>	(n.a.)	(n.a.)
<i>Schönfeld et al.</i> 2016 [53]	M3 <sup>c</sup>	Recombinante	95,7 $\mu\text{M}$ scan de temperatura	DLS	0,3 (0,003) <sup>c</sup>	(n.a.)	(n.a.)
<i>Tárraga et al.</i> 2021 [159]	Equilibrio único	Recombinante	0,1-100 $\mu\text{M}$ (25 °C)	Fluorescencia de pireno	0,27-0,014 <sup>d</sup>	(n.a.)	(n.a.)
<i>Tárraga et al.</i> 2021 Tesis Doctoral	M1	Recombinante	0,1-100 $\mu\text{M}$ (25 °C)	Fluorescencia de pireno	2,6 <sup>d</sup>	0,045 <sup>d</sup>	0,010 <sup>d</sup>

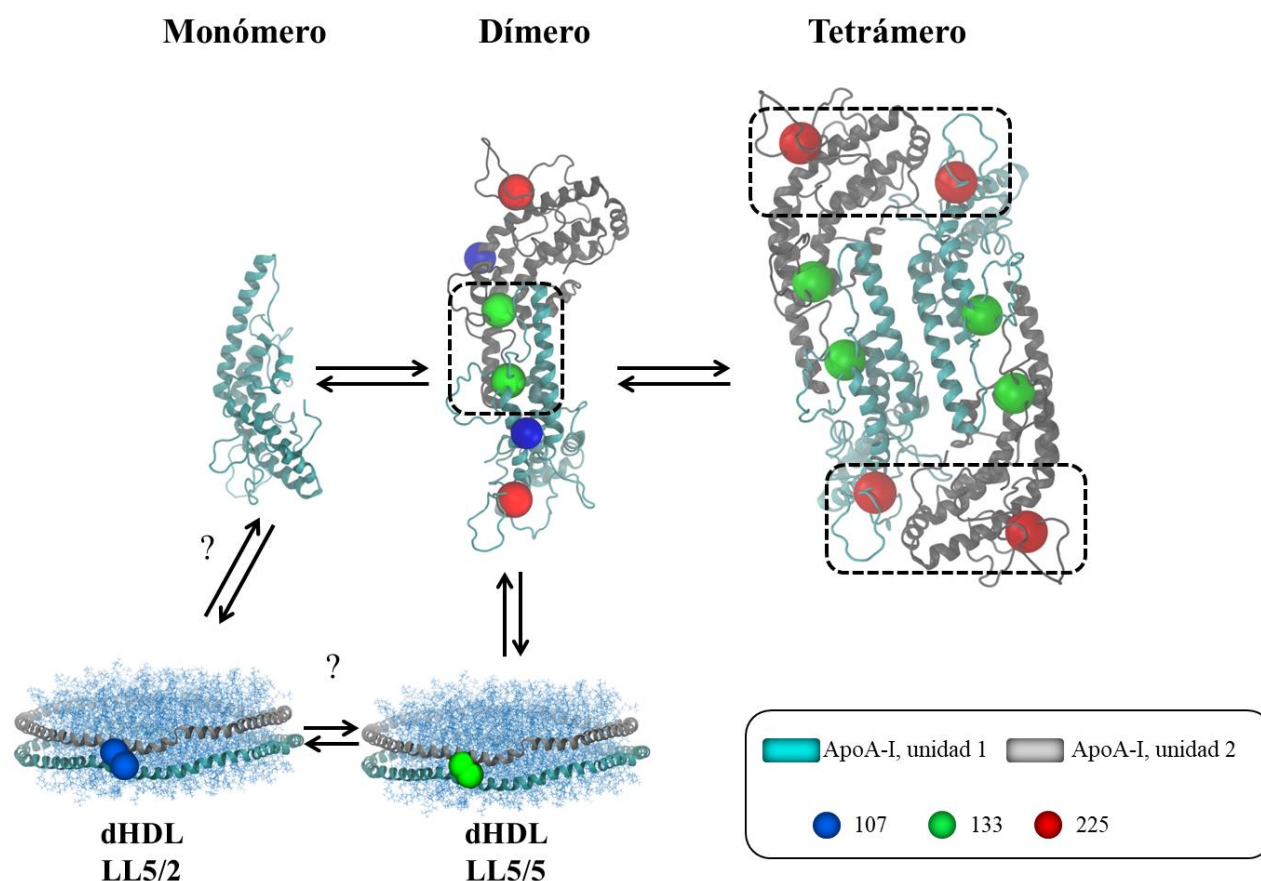
La tabla muestra los distintos valores de  $K_A$  reportados en apoA-I para distintos modelos de asociación múltiple. En cada caso se muestra el origen de la proteína (suero o recombinante), el rango de concentración, la temperatura del experimento y la metodología utilizada. Los valores de  $K_A$  son presentados con notación decimal para el primer equilibrio y con científica para los equilibrios restantes en M2.<sup>(a)</sup> Los valores de  $K_A$  presentados por *Prieto et al.* 2011 [52] son un promedio de dos consideraciones: separación equidistante de residuos de Trp en oligómeros y eficacia de *homoquenching* y homotransferencia independiente del tamaño del oligómero.<sup>(b)</sup> El modelo M4 es una variante con una  $K_A$  propuesta por *Prieto et al.* 2011 a diferencia del utilizado en esta Tesis Doctoral.<sup>(c)</sup> Este modelo M3 se diferencia del desarrollado en esta Tesis Doctoral por un factor de nucleación  $\alpha$  adimensional que afecta al primer equilibrio en la forma  $\alpha \cdot K_A1$  y es presentado junto con su valor de  $K_A1$  entre paréntesis.<sup>(d)</sup> Los valores de  $K_A$  se muestran como promedios para cada evento de asociación expresados como  $\mu\text{M}_{\text{dim}} \cdot \mu\text{M}_{\text{mon}}^{-2}$ ,  $\mu\text{M}_{\text{tet}} \cdot \mu\text{M}_{\text{dim}}^{-2}$  y  $\mu\text{M}_{\text{oct}} \cdot \mu\text{M}_{\text{tet}}^{-2}$  en función de los resultados presentados en las **Tabla 2.7** y **Tabla 2.13**. **M1**, modelo de asociación secuencial progresiva; **M2**, modelo de asociación discreta; **M3**, modelo de asociación indefinida por adición de monómeros; **M4**, modelo de asociación indefinida por adición de dímeros; **AUC**, ultracentrifugación analítica; **ITC**, calorimetría de titulación isotérmica; **DLS**, dispersión dinámica de luz; y (n.a.), no aplicable.

Luego de haber estudiado la auto-asociación de apoA-I en ausencia de lípidos, nos propusimos como siguiente objetivo evaluar si eventos de asociación similares son observados en asociación con membranas fosfolipídicas. La hipótesis de estos experimentos se fundamentaba en la relación, previamente establecida, entre la configuración de apoA-I en solución y en rHDL, donde el paso intermedio entre estos dos procesos corresponde una asociación entre unidades de apoA-I en membrana fosfolipídicas. Se esperaba evaluar un arreglo LL5/5, en base a los resultados experimentales presentados en esta Tesis Doctoral, o un arreglo LL5/2 como parte de resultados previos del laboratorio del Dr. Horacio Garda. En estos últimos, inicialmente, *Toledo et al.* 2004 [149] reportaron que tanto apoA-I como el péptido AI 77-120 se encuentran en formas oligoméricas en el estado de unión a lípidos; y luego *Prieto et al.* 2011 [52], con las mutantes de único Trp en la región central de apoA-I (mutantes @93, @104 y @108) y en asociación con vesículas fosfolipídicas compuestas de distintos lípidos paramagnéticos (tempo-PC, 5-doxil-PC, 10-doxil-PC y 14-doxil-PC; PC, fosfocolina), observaron una auto-asociación en las posiciones 93, 104 y 108. Esto indicaría una inserción del par de hélices H3-H4 de dímeros de apoA-I, que podría preestablecer en asociación con membrana una configuración LL5/2 en rHDL. Desafortunadamente,

nuestros resultados preliminares de asociación con membranas lipídicas no parecen indicar una auto-asociación que preestablezca configuraciones LL5/5 o LL5/2 previa a la formación de rHDL. Creemos que estas observaciones, en particular en la configuración LL5/5, podrían deberse a orientaciones y acoplamientos sub-óptimos entre los residuos marcados con pireno y por cambios en la orientación entre las hélices cuando estas se asocian con membranas fosfolipídicas. Es así que futuros experimentos podrían llevarse a cabo para evaluar nuestra hipótesis tales como evaluación de proximidad entre residuos de Cys por entrecruzamiento químico; realización de experimentos similares con derivados de la sonda NPM con grupos acilo de distinta longitud, de esta manera, evitando así problemas de orientación entre las moléculas de pireno y aumentando la eficiencia de formación excímeros; y aunque más difícil, podríamos utilizar otras variantes mutantes de Cys tales como E205 y K206 que son encontradas en registrar la configuración LL5/2 [152].

Para finalizar con nuestros resultados, evaluamos la capacidad de nuestras variantes mutantes de Cys marcadas con pireno de censar las configuraciones LL5/5 y LL5/2 inicialmente reportadas por *Silva et al.* 2005 [81] y luego en el laboratorio del Dr. Horacio Garda por *Cuellar et al.* 2014 [129]. Nuestros resultados preliminares respaldan un arreglo LL5/5, aunque no observamos grandes incrementos de fluorescencia de excímero, posiblemente debido a un acoplamiento sub-óptimo entre pirenos. Por otro lado, lamentablemente la mutante K107C no demostró un arreglo LL5/2 en rHDL reconstituidas por microsolubilización directa. A pesar de estas limitantes, pudimos observar dimerización a través de la hélice H5 en lo que suponemos son rHDL generadas por células, validando nuestros resultados con modelos *in vitro* y respaldando la hipótesis general de que la especie funcional en solución corresponde a un dímero con un arreglo H5/H5. Por lo tanto, en base a nuestras observaciones, y conociendo actualmente la dinámica de las rHDL debemos realizar más experimentos para determinar cuáles son las condiciones que desplazan el equilibrio  $LL5/5 \rightleftharpoons LL5/2$  hacia la configuración LL5/2 y en qué etapa del proceso de biogénesis de rHDL esta configuración se genera.

En conclusión, basándonos en los resultados presentados en esta Tesis Doctoral hemos propuesto que la auto-asociación de apoA-I es un proceso que facilita la formación de rHDL (**Figura 3.1**). En este modelo, un dímero en una orientación antiparalela sería la mínima especie funcional que tendría la capacidad de formar estructuras de dHDL cuya concentración será regulada por las necesidades fisiológicas. Esta especie puede ser encontrada en condiciones fisiológicas, donde la concentración plasmática de apoA-I libre de lípidos se puede estimar aproximadamente en 0,15 mg/ml (5  $\mu$ M). Al mismo tiempo, esta fracción, que en principio resulta mínima para inducir la formación de grandes especies oligoméricas, puede ser incrementada en determinadas condiciones patológicas, como por ejemplo por el desplazamiento de apoA-I por la proteína sérica Amiloide-A [160], así como también puede ser relevante en el espacio de la arteria subendotelial donde apoA-I ejerce su principal función antiaterogénica al remover el colesterol de las células [48].



**Figura 3.1: Modelo de generación de dHDL.** Se representan distintos estados oligoméricos obtenidos por *docking* molecular para el dímero y tetrámero de apoA-I y las dos configuraciones típicas de rHDL (LL5/5 y LL5/2). Con línea de puntos se muestran aquellas posiciones que mostrarían proximidad durante la auto-asociación. Código de color: unidad 1 (cian), unidad 2 (rojo), 107 (azul), 133 (verde) y 225 (rojo). Con signos de interrogación se resaltan aquellos equilibrios no resueltos en esta Tesis Doctoral.

En esta Tesis, se ha abordado el estudio de la relevancia de las hélices H4, H5 y H10 en sus distintos estados de asociación. Nuestros resultados sugieren que existe una relación entre estos distintos eventos, pero más experimentos deben de llevarse a cabo para complementar nuestros resultados en solución acuosa. Nuestras observaciones deben de ser evaluadas con otras metodologías tales como por oxidación o entrecruzamiento químico con reactivos sensibles a los residuos de Cys en las mutantes utilizadas. Los modelos de asociación preliminares propuestos para las especies dimérica y tetramérica deben de ser re-analizados por MD como paso previo y posterior al *docking* molecular con tiempos de simulación que permitan evaluar nuestras observaciones experimentales y de aquellas reportadas en bibliografía (XL-MS, EPR, *etc.*). Al mismo tiempo, estas



estructuras oligoméricas pueden ser dilucidadas por entrecruzamiento químico sobre residuos de lisina en una mutante de ausencia total de residuos de Trp, donde se ha observado que esta variante muestra una formación de oligómeros que permite aislarlos y caracterizarlos individualmente [48]. También sería interesante evaluar si son diferentes las asociaciones en ausencia y presencia de la región C-terminal. De esta manera, estos estudios podrían esclarecer cómo se lleva a cabo la asociación en las especies dimérica y tetramérica, y finalmente poder determinar cuáles son las estructuras oligoméricas de apoA-I.

Por otro lado, en base a nuestros resultados de asociación con membranas fosfolipídicas, sería interesante evaluar *in vitro* la hipótesis de interconversión entre las distintas configuraciones de rHDL (LL5/5 y LL5/2), a través de la realización de cinéticas de microsolubilización directa de vesículas a la temperatura de transición de fase del lípido DMPC con nuestras mutantes marcadas con pireno u otras tales como E205 y K206. La realización de estos experimentos debería proporcionarnos una mayor probabilidad de observar la configuración LL5/2 evitando así la reducción en la señal de excímero por el rápido intercambio de apoA-I entre su forma libre y en asociación con rHDL, y el intercambio de apoA-I entre rHDL. También, la evaluación de la capacidad de reconstitución con mutantes de Cys de configuración restringida en solución nos indicaría cuál de las dos configuraciones posee mayor capacidad de formar rHDL. Estos experimentos *in vitro* pueden desarrollarse en presencia de vesículas de distinta carga superficial total y en presencia de colesterol, pudiendo variar nuestros resultados. Por otro lado, nos hace falta evaluar la reconstitución de rHDL *in vivo* en presencia de diferentes tratamientos tales como la estimulación de las células en cultivo con cAMP y la preincubación de estas con colesterol. De esta manera, estos resultados podrían apoyar nuestras observaciones sobre la función de la rHDL, del cual disponemos actualmente, y determinar cuál es la función de las rHDL en el rol contra la aterosclerosis.

Como conclusión general de este trabajo de Tesis Doctoral se destaca el uso de la sonda fluorescente multiparamétrica pireno en evaluar la auto-asociación de apoA-I en solución, un sistema complejo y multicomponente, como también asociaciones en sistemas macromoleculares con lípidos. Esta es una herramienta dinámica que puede ser utilizada en un amplio rango de concentraciones con mínima distorsión de los equilibrios, a diferencia de otras técnicas basadas en separaciones como AUC o SEC. Además de estas ventajas metodológicas, nuestros estudios muestran una clara relación entre la oligomerización y la biogénesis de HDL en particular con la configuración LL5/5. Estudios posteriores sobre esta relación pueden abrir paso al desarrollo de técnicas protectoras contra la acumulación de colesterol en las paredes vasculares y así reducir el riesgo contra la aterosclerosis.

# **Capítulo 4:**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Esta página se encuentra en blanco

## 4.1 Protocolos generales

### 4.1.1 Obtención de células competentes

La obtención de células competentes es un paso esencial cuando se quiere incorporar vectores dentro de una cepa de *E. coli*. A continuación, se describe el protocolo de generación de bacterias competentes utilizado en JM109, una cepa de clonado, y en BL21 (DE3), una cepa de expresión, siendo el propósito individual en ambas, la amplificación del DNA plasmídico y expresión de proteínas recombinantes, respectivamente.

Se estría en LB-Agar, con su respectivo antibiótico cuando sea necesario, la cepa bacteriana de interés y se deja incubar toda la noche en estufa a 37 °C. Al día siguiente se inoculan en 5 ml de medio de cultivo líquido de crecimiento súper óptimo (SOB, 2 % triptona, 0.5 % extracto levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM MgSO<sub>4</sub>) tres (3) colonias y se vuelve a incubar toda la noche en agitación a 37 °C. Luego se toma 1 ml del cultivo y se diluye en 250 ml de medio SOB, dejando nuevamente incubar en agitación hasta alcanzar una DO<sub>600 nm</sub> de 0,6. Una vez que el cultivo llega a la densidad óptica deseada, se deja reposar en hielo durante 15 min y se centrifuga el cultivo durante otros 15 min adicionales a 5000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4 °C. Luego se resuspende el pellet en buffer de transformación (TB, 10 mM HEPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl y 55 mM MnCl<sub>2</sub>), y se vuelve a incubar 10 min finales en hielo para luego centrifugar el medio y obtener un pellet final. Por último, este pellet se resuspende en 10 ml de buffer TB y se agrega cantidad suficiente de DMSO (100 %) hasta alcanzar 7 % de concentración final. Finalmente, la mezcla resultante se alícuota en tubos eppendorf de 500 µl y se almacena a -70 °C.

### 4.1.2 Transformación de bacterias competentes

La transformación es un método que permite la incorporación de material genético en una célula huésped, en nuestro caso en bacterias competentes de *E. coli*. Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron JM109 y BL21 (DE3), la primera una cepa de clonado y la segunda una cepa de expresión. El protocolo consiste en introducir material genético en células de interés sin perder la viabilidad de estas (en este protocolo por shock térmico), para luego dejar que se recuperen por incubación a 37 °C en un medio sólido rico en nutrientes.

Bacterias competentes previamente descongeladas son alicuotadas en volúmenes de 100 µl y luego mezcladas con 3 o 1 µl de producto de PCR o de minipreb, respectivamente. La mezcla se deja reposar en hielo durante 20-30 min e inmediatamente se deja incubar a 42 °C en un baño de agua durante exactamente 1 min. Luego se incuba durante 3 min adicionales en hielo y se agrega 300 µl de medio de cultivo SOB con represión de catabolito (SOC, 2 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 0,36 % glucosa, 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl). Después la mezcla se deja recuperar durante 30 min a 37 °C, y por último se estría en placas de LB-Agar con el antibiótico apropiado y se deja incubar toda la noche a 37 °C. Finalmente, se seleccionan aquellas colonias aisladas con un tamaño uniforme, que serán aquellas que incorporaron el plásmido durante la transformación.

### 4.1.3 Expresión y purificación de mutantes de cisteínas de apoA-I

La purificación de una proteína es una etapa esencial en la adquisición de resultados confiables en experimentos biofísicos. Esencialmente, se recurre a una serie de pasos que van enriqueciendo nuestra proteína de interés progresivamente manteniendo la integridad química y estructural de esta, siendo necesaria una forma de monitorear el rendimiento y la pureza a lo largo del protocolo de purificación. En la purificación de proteínas conteniendo residuos de Cys hay que tomar precauciones adicionales que permitan mantener la integridad química de estos como también

evitar enriquecimientos en proteínas ricas en estos residuos. El protocolo de purificación utilizado es el propuesto por *Ryan et al.* 2003 [131] y *Prieto et al.* 2012 [130] con ligeras modificaciones.

La purificación de mutantes puntuales de Cys se llevó a cabo de la siguiente forma. Se cultivan bacterias en 10-20 ml de LB con Kan 50 µg/ml con *E. coli*. BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET30a-ApoA-I durante toda la noche en agitación a 37 °C. A la mañana siguiente el cultivo se reparte en 8 erlenmeyers de 500 ml cada uno, diluyendo el cultivo inicial de 1 ml a 250 ml en medio fresco, y se incuba de nuevo a 37 °C hasta alcanzar una  $DO_{600\text{ nm}}$  entre 0,6 y 1. En esta etapa, la expresión de proteínas es inducida mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 0,4 mM. Las bacterias se incuban durante 3 hs adicionales con agitación a 37 °C y se cosechan por centrifugación a 5000 rpm durante 30 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Avanti JE). En esta etapa los pellets bacterianos pueden ser conservados a -20°C para su posterior procesamiento.

El pellet bacteriano se resuspende en buffer de lisis EQB + 6 M GdHCl y 10 mM BME a pH 7,4 y se lisan las bacterias en un sonicador de punta en un baño de hielo-agua. El sobrenadante es separado de los restos de pared celular junto con bacterias no lisadas por ultracentrifugación a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Avanti JE). Luego este sobrenadante se diluye con igual volumen de buffer EQB sin GdHCl + 10 mM BME y 10 mM Imidazol a pH 7,4, donde la muestra final queda disuelta en buffer EQB + 3 M GdHCl y 10 mM BME, que denominamos buffer EGB suplementado con 5 mM Imidazol a pH 7,4.

El extracto de proteínas solubles del paso anterior se siembra en una columna cromatográfica por IMAC [161], previamente equilibrada con buffer EGB + 5 mM Imidazol a pH 7,4, se eliminan las impurezas retenidas eluyendo con buffer EGB más 5 mM y 35 mM de Imidazol, respectivamente, y se eluye nuestra proteína de interés como un pico importante con 100 mM de Imidazol. La pureza relativa de esta última fracción es analizada en un gel de SDS-PAGE 14 % antes de seguir con los siguientes pasos de purificación.

El siguiente paso de purificación tiene el propósito de separar químicamente el *His-Tag* N-terminal de apoA-I. La proteína purificada en buffer EGB se lleva a 6 M GdHCl pH 7,4 y se diluye con volumen suficiente de una solución de ácido fórmico al 98-100 % para llevar la muestra al 45 % de ácido y se incuba a 55 °C durante 5 hs en agitación [162]. Luego la muestra se dializa exhaustivamente durante 24-48 hs a 4 °C en buffer EQB +10 mM BME con cantidad suficiente de NaOH para llevar el pH de la solución a un pH final de 7,4. Finalmente, la solución resultante en buffer EGB a pH 7,4 se almacena a -20°C para su posterior paso de purificación.

La proteína del paso anterior se somete por segunda vez a un paso de purificación por IMAC, pero con el objetivo de separar el *His-Tag* de nuestra proteína de interés. Esta se siembra en una columna IMAC, previamente equilibrada con buffer EGB a pH 7,4, y se conservan únicamente aquellas fracciones que son débilmente retenidas y eluidas con 5 mM Imidazol (por la cantidad que histidinas que tiene apoA-I, esta posee una ligera afinidad por el Níquel). Estas fracciones luego se juntan y se concentran en un dispositivo concentrador (Millipore) con punto de corte de 10 kDa, para luego poder seguir la pureza relativa de esta fracción por SDS-PAGE 16 %.

La proteína purificada del paso anterior es sujeta a un último paso de purificación por cromatografía de intercambio aniónico. Nuestra solución de proteína se dializa exhaustivamente en buffer 30 mM Tris con 10 mM BME a pH 8, luego se resuspende en 4 M Urea, y finalmente se filtra con punto de corte 0,22 µm previa a la siembra en una columna de intercambio aniónico (MonoQ). Se eluye con un gradiente de NaCl entre 10 y 35 % partiendo de una solución madre de 1 M, colectando fracciones de 5 ml a un flujo de aproximadamente 1-1,5 ml/min. La pureza relativa de cada una de estas fracciones se analiza por SDS-PAGE 16 %, se juntan todas aquellas con un buen grado de pureza y se concentran en dispositivos concentradores con punto de corte de 10 kDa (Millipore). Por último, se almacena nuestra proteína purificada en buffer PBS + 3 M GdHCl y 10 mM BME a pH 7,4, habiéndose eliminado la Urea por diálisis, y se conserva la misma a -20°C.



En cada paso de purificación se monitorea y cuantifica la concentración total de proteínas por absorbancia a 280 nm ( $A_{280\text{ nm}}$ ) en presencia de 3 M GdHCl, utilizando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{280\text{ nm}}$ ) de 37930 y 32430  $\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , para el *His-Tag* ApoA-I y apoA-I, respectivamente, que se estiman en base a la composición de residuos aromáticos con capacidad de absorbancia (residuos Try, Trp y Phe) y en ausencia de estructura terciaria [130] (<https://web.expasy.org/protparam/>).

#### 4.1.4 Expresión y purificación de apoA-I WT

La purificación de apoA-I WT recombinante siguió un protocolo similar al empleado en variantes mutantes de Cys, pero con algunas modificaciones. Las etapas de purificación que involucran cromatografía de afinidad por Níquel se llevan a cabo en 1 M GdHCl y se eluyen las impurezas y nuestra proteína de interés con 70 y 100 mM Imidazol, respectivamente. Al mismo tiempo, todos los pasos de purificación se llevan a cabo en ausencia de BME.

#### 4.1.5 Marcación de proteínas

La unión covalente de moléculas fluorescentes a residuos de Cys, localizados en sitios específicos, ha sido y sigue siendo una herramienta útil para el estudio conformacional en proteínas. La especificidad de la reacción se logra aprovechando la química de distintos grupos funcionales como el grupo maleimida o iodoacetamida, que son reactivos a grupos tiols, pudiéndose mejorar la especificidad variando las condiciones de pH, el grado de accesibilidad a los residuos de Cys (con agentes desnaturizantes como el GdHCl) y eliminado del medio todas aquellas especies con menor reactividad (grupos amino).

En nuestro caso, hicimos uso de la química específica entre el grupo tiol de residuos de Cys y el grupo maleimida del NPM. La reacción se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes (3 M GdHCl), libres de grupos aminos (por ejemplo Tris) a pH 6,5 para evitar reacciones secundarias

no deseadas [163,164]. Como control, la reacción se lleva a cabo en paralelo con apoA-I WT, para evaluar el grado de marcación inespecífica en esta última.

Proteínas previamente almacenadas en buffer PBS + 3 M GdHCl y 10 mM BME se dializan exhaustivamente en buffer PBS + 7 mM EDTA a pH 6,5 toda la noche. Luego estas se diluyen con igual volumen del mismo buffer suplementado con 6 M GdHCl a pH 6,5. Luego se cuantifica la concentración total por  $A_{280\text{ nm}}$ , utilizando un  $\epsilon_{280\text{ nm}}$  de  $32430\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ .

La marcación se lleva a cabo de la siguiente manera. Primero, sobre una solución de proteína se agrega un exceso de TCEP en una relación 10:1 (TCEP:apoA-I) y se incuba durante 1 hs a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitación. Luego se agrega un volumen suficiente de DMSO al 100 % a la mezcla para llevar la misma a un 30 % final de DMSO. Después se añade un exceso de NPM (disuelto en DMSO) en una relación 5:1 (NPM:apoA-I) fraccionados en tres agregados, incubando cada uno durante 1 hs a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y reponiendo el TCEP en exceso en el segundo y último agregado. Finalmente, se bloquea el exceso de NPM con un agregado final de glutatión reducido en exceso en una relación 10:1 (glutatión:NPM) y se incuba 1 hs adicional a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante.

La muestra con proteína marcada luego es separada del exceso de sonda sin marcar. Primero, la solución resultante del paso previo de marcación se concentra a un volumen final de 1-2 ml, utilizando dispositivos de concentración de punto de corte de 10 kDa (Millipore). Luego se siembra en una columna de desalado Sephadex G-25 de 10 ml de capacidad y se eluye en forma isocrática con una fase móvil (PBS + 4 M Urea y 10 mM BME a pH 6,5) colectando entre 15 y 20 fracciones de 1 ml cada una, a un flujo por gravedad. Después se monitorea la concentración total de proteína de apoA-I y NPM en cada fracción por  $A_{280\text{ nm}}$  y  $A_{343\text{ nm}}$ , utilizando los coeficientes de extinción molar de  $32430\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  y  $36000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ . Adicionalmente, en aquellas fracciones donde se registra absorbancia de proteína, se toman pequeñas alícuotas y se evalúa la presencia de Cys libres por reacción con 5,5'-Ditiobis(Ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) midiendo la absorbancia a 412 nm ( $A_{412\text{ nm}}$ ). Luego, se seleccionan aquellas fracciones que conservan la mayor concentración de

proteína y se dializan para eliminar la Urea. Adicionalmente, posterior a la diálisis, se estima el grado de marcación por cuantificación del NPM y apoA-I como se describe en la sección siguiente. Finalmente, la solución resultante se almacena en buffer PBS + 3 M GdHCl a pH 7,4 y se concentra a una concentración total de proteína de alrededor de 100-150  $\mu\text{M}$ , almacenándose a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso en experimentos biofísicos.

#### 4.1.6 Cuantificación del grado de marcación

Conocer el grado de marcación en proteínas marcadas es esencial ya que influye en la propia señal de fluorescencia que estamos investigando, y que como se desarrollará más adelante, este es un parámetro más en el desarrollo de modelos matemáticos de oligomerización para el análisis de mutantes de apoA-I marcadas con pireno.

El grado de marcación se calcula sobre la muestra final dializada previa a los experimentos biofísicos, como cociente entre la concentración total de NPM y proteína, respectivamente, expresadas en  $\mu\text{M}$  (**Ecuación 1**).

$$g = \frac{\text{Concentración de NPM } (\mu\text{M})}{\text{Concentración de proteína } (\mu\text{M})} \quad (1)$$

La concentración total de proteína se calcula en buffer PBS a pH 7,4 por BCA, utilizando un patrón de apoA-I WT purificada de concentración calculada por  $A_{280\text{ nm}}$  en 3 M GdHCl y utilizando un  $e_{280\text{ nm}}$  de  $32430\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ . La concentración total de NPM se obtiene diluyendo la muestra en buffer PBS + 3 M GdHCl a pH 7,4, midiendo su  $A_{343\text{ nm}}$  y utilizando un  $e_{343\text{ nm}}$  de  $36000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  [164]. En ambos casos (apoA-I y NPM), y en todas las mediciones realizadas, se utiliza *Lambert Beer* ( $A_\lambda = e_\lambda \cdot l \cdot [C]$ , donde  $A_\lambda$  es la absorbancia,  $l$  el paso óptico en cm,  $e_\lambda$  el coeficiente de extinción molar y  $[C]$  la concentración de proteína a estimar) y se realizan medidas entre 0 y 1 (unidades arbitrarias) por triplicado promediando los resultados.

### 4.1.7 Ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (BCA)

El ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (Sal disódica del ácido 2,2'-Biquinoline-4,4'-dicarboxílico, BCA), es una variante del método de Lowry [165], y se utiliza en la cuantificación total de proteínas en una muestra. Cuenta con la ventaja de ser sensible a concentraciones bajas de proteínas, tolerar sustancias interferentes, ya sean agentes reductores o detergentes, y de ser una técnica independiente de modificaciones químicas que puedan sufrir los residuos en una proteína, en particular la unión covalente de sondas fluorescentes.

Con este método colorimétrico, en una primera etapa el  $\text{Cu}^{+2}$ , que se mantiene en solución en medio alcalino gracias a un complejo con tartrato, se reduce en presencia de péptidos y da la clásica reacción de *Biuret* al complejarse con péptidos con una coloración azul-violáceo. En la segunda etapa, el complejo es rápidamente desplazado por dos moléculas del BCA formando un nuevo complejo muy estable y de color violáceo más intenso, mejorando así el límite de detección.

El protocolo para microplacas consiste en colocar en cada pocillo el volumen adecuado de muestra y se lleva a 150  $\mu\text{l}$  con solución fisiológica. Además, se colocan 150  $\mu\text{l}$  de las diluciones del patrón estándar (en nuestro caso apoA-I WT). Luego se agregan 150  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo, que consiste en la mezcla de 25 partes de la Solución A (4 % tartrato de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , 3 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 0,2 N NaOH); 24 partes de la Solución B (0.5 % BCA) y 1 parte de la Solución C (4 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). La microplaca se agita y se incuba 2 hs a 37 °C. Finalmente, se mide la intensidad del color por absorbancia a 562 nm. Se traza la curva patrón, y a partir de ella se interpola la concentración de proteína en las muestras, corrigiendo por la dilución efectuada en cada caso.

### 4.1.8 Sistema de gel desnaturizante (SDS-PAGE)

Para monitorear la purificación y el tamaño molecular de las proteína obtenidas se utiliza el sistema de geles desnaturizantes discontinuos desarrollado por *Laemmli et al.* 1970 [166]. Este

consiste de dos composiciones de geles, la primera parte, superior (*Stacking*), sirve para apilar (concentrar) las proteínas en un frente, mientras que la segunda parte, inferior (*Resolving*), permite resolver la mezcla de proteínas por tamaño molecular. La composición de los geles se logra mezclando acrilamida, bis-acrilamida y SDS en un buffer Tris-Glicina. Las muestras se desnaturalizan por calor a 100 °C y se siembran junto con un buffer muestra para seguir el frente de corrida. Finalmente, los geles son teñidos con solución colorante *Coomassie Blue*, durante 5-6 hs en agitación y se decolora con solución de metanol/ácido acético/agua.

#### **4.1.9 Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUV)**

Las vesículas LUV se preparan por extrusión según la técnica descrita por *Prieto et al.* 2012 [52]. Brevemente, lípidos puros disueltos en CHCl<sub>3</sub> se mezclan en un balón de cuello esmerilado, se secan bajo una corriente de N<sub>2</sub> formando un film delgado sobre el balón de vidrio. Luego este se seca por vacío durante 3 hs en oscuridad en un liofilizador para eliminar trazas de CHCl<sub>3</sub> que hayan quedado presentes. Después el film resultante se resuspende en buffer TBS + 0,01 % EDTA y 0,01 % NaN<sub>3</sub> a pH 7,4 (buffer TBSE) libre de fosfatos por agitación durante 1 hs a 37 °C, obteniéndose MLV. Luego las LUV se obtienen extruyendo 11 veces la suspensión de fosfolípidos empleando un filtro de policarbonato de 100 nm de poro en un extrusor *Liposofast* (Avestin, Canada). Finalmente, la solución de LUV se colecta en un vial de vidrio y se almacena a 4°C para su posterior cuantificación por fósforo inorgánico.

#### **4.1.10 Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV)**

Las vesículas SUV se preparan de acuerdo al protocolo presente en los trabajos de *Huang et al.* 1974 [167] y *Storch et al.* 1986 [168]. Brevemente, lípidos puros disueltos en CHCl<sub>3</sub> se mezclan en un balón de cuello esmerilado, se secan bajo una corriente de N<sub>2</sub> formando un film.

Luego se secan durante 12 hs en oscuridad por vacío en un liofilizador para eliminar trazas de  $\text{CHCl}_3$ . Después se resuspenden en buffer TBSE libre de fosfatos por agitación durante 1 hs a 37 °C, obteniéndose MLV. Luego la mezcla de fosfolípidos se sonica bajo  $\text{N}_2$  en un baño de agua-hielo durante 45 min hasta clarificar la suspensión. Las vesículas de interés son obtenidas por ultracentrifugación a 35000 G durante 30 min descartando el precipitado y conservando el sobrenadante donde se encuentran las vesículas SUV. Finalmente, la solución de SUV se colecta en un vial de vidrio y se almacena a 4°C en una atmósfera de  $\text{N}_2$  para su posterior cuantificación por fósforo inorgánico.

### 4.1.11 Cuantificación de fósforo inorgánico

La cuantificación de membranas fosfolipídicas artificiales se realiza por el ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico, según la técnica de *Ames et al.* 1960 [169]. Se prepara una curva estándar empleando una solución de 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Las muestras se preparan en tubos limpios (libre detergente y de otras fuentes de fósforo) tomando alícuotas de entre 5 y 15  $\mu\text{l}$  por duplicado, al igual que las muestras para la curva estándar y el blanco. Se agregan 30  $\mu\text{l}$  de una solución de 10 %  $\text{Mg}(\text{NO}_3)$  en etanol y se carboniza a la flama. Luego se agregan 400  $\mu\text{l}$  de 0,5 N HCl, se agita bien en vortex y los tubos se incuban por 30 min en baño de agua a 100 °C. Después se agrega a cada tubo 930  $\mu\text{l}$  de una solución 1:6 (vol/vol) de ácido ascórbico (10 % peso/vol): ácido molíbdico, se agita vigorosamente y se incuban nuevamente las muestras durante 1 hs a 37 °C. Finalmente, se mide la absorbancia de las muestras a 820 nm en un espectrofotómetro y se calcula la concentración de los fosfolípidos interpolando su valor desde la curva patrón.

#### 4.1.12 Tratamiento con células THP-1

Aproximadamente una concentración de 700000/ml de células THP-1 fueron sembradas en frascos de cultivo celular e incubadas por 24 hs con 8 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml) y con 10 % de suero fetal bovino en una atmósfera controlada de 5 % de CO<sub>2</sub>. Asimismo, en dicho medio de cultivo se adicionó ésteres de forbol a una concentración de 200 nM para permitir la transformación de monocitos en macrófagos que forman una monocapa de células en la superficie del frasco de cultivo. Luego el medio fue removido, se lavaron las monocapas celulares con buffer PBS a pH 7,4 y se realizó el tratamiento con medio de cultivo RPMI sin suero con solución de proteínas de las variantes mutantes de Cys marcadas con pireno K107C y K133C, y con el control apoA-I WT, cada una a una concentración final de 20 µg/ml durante 24 hs. Finalmente, el medio fue colectado y almacenado en presencia de 10 % sacarosa a -70 °C.

Para evaluar la formación de las partículas de dHDL, el medio de cultivo es descongelado a temperatura ambiente, concentrado a 1-1,5 ml utilizando dispositivos concentradores de 10 kDa (Millipore) y finalmente fraccionado por exclusión molecular (Superdex 200) para, de esta manera, separar apoA-I libre de aquellas reconstituidas con lípidos por células (dHDL). Luego, sobre cada una de estas fracciones, se adquieren espectros de emisión de fluorescencia excitando a 345 nm y recogiendo la emisión entre 350 y 650 nm, midiendo cada 0,5 nm por triplicado y promediando los espectros.

## 4.2 Protocolos experimentales

### 4.2.1 Control de integridad estructural

La obtención, purificación y marcación con sondas fluorescentes de variantes mutantes de proteínas deben ser evaluadas con distintas técnicas experimentales que permitan controlar la integridad estructural y/o conformacional de estas. Para tal fin, hacemos uso de la fluorescencia intrínseca de residuos de Trp en apoA-I. Esta posee 4 Trp a lo largo de su secuencia en las posiciones 8, 50, 72 y 108, cuya longitud de onda máxima es sensible al grado de exposición al solvente.

Para comprobar que las variantes mutantes se pliegan correctamente se midieron espectros de emisión de fluorescencia del Trp en apoA-I (disuelta en buffer PBS a pH 7,4 a una concentración de 0,1 mg/ml) a concentraciones crecientes de GdHCl, un desnaturalizante, entre 0 y 3 M. Los espectros fueron registrados en un espectrofotómetro SLM4800 actualizado por Olis (ISS Inc., Champaign, IL). Las condiciones generales que se utilizaron fueron: longitud de onda de excitación 295 nm, rango de emisión entre 300 y 560 nm y tiempo de integración de 0,25 seg por cada nanómetro recogido. Cada espectro de emisión es analizado por localización de su CM (centro de masa) y posterior ajuste de estos datos (pares de concentración de GdHCl y CM) a un modelo matemático para poder así estimar sus parámetros fisicoquímicos que reportan la estabilidad de estas proteínas en solución.

#### 4.2.1.1 Estimación del centro de masa

A continuación, se describe el método utilizado para caracterizar los cambios espectrales de la emisión de Trp bajo la influencia de agentes desnaturalizantes, en este caso el GdHCl.

El método utilizado fue a partir del cálculo del CM. Este se calcula haciendo uso de la siguiente ecuación (**Ecuación 2**):



$$CM = \frac{\sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \lambda \cdot I(\lambda)}{\sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} I(\lambda)} \quad (2)$$

dónde  $I(\lambda)$  representa la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda determinada ( $\lambda$ ), mientras que  $\lambda_{\max}$  y  $\lambda_{\min}$  corresponden al rango en longitudes de onda en la adquisición de espectros de fluorescencia.

La ecuación permite calcular el CM de un espectro, expresada como longitud de onda, sobre el cual se distribuye en forma equitativa la fluorescencia en ambas direcciones del espectro. De esta manera, este parámetro puede proporcionar una medida de los corrimientos espectrales que sufre un espectro bajo determinadas condiciones, en nuestro caso la presencia de GdHCl.

#### 4.2.1.2 Desnaturalización con GdHCl

En este apartado se describe el modelo utilizado para evaluar los cambios espectrales de la emisión de fluorescencia del Trp en presencia de GdHCl. El modelo utilizado es válido bajo las siguientes dos suposiciones: 1), equilibrio único entre dos especies: N-U; y 2), reversibilidad del equilibrio. El modelo utilizado es el siguiente [170] (**Ecuación 3**).

$$CM [D] = \frac{(CM_{NH_2O} + CM_{UH_2O}) \cdot e^{-\Delta G_{H_2O}^0 \left( \frac{-m \cdot [D]}{R \cdot T} \right)}}{\left( 1 + e^{-\left( \frac{\Delta G_{H_2O}^0 - m \cdot [D]}{R \cdot T} \right)} \right)} \quad (3)$$

donde  $CM_{NH_2O}$  y  $CM_{UH_2O}$  son los valores de  $CM$  para las especies N y U, respectivamente;  $m$ , es la cooperatividad del proceso;  $R$  y  $T$ , la constante de los gases y la temperatura del experimento;  $\Delta G_{H_2O}^0$ , la estabilidad de la proteína en condiciones estándar; y  $[D]$ , la concentración de GdHCl.

El ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto proporciona la energía libre del equilibrio en condiciones estándar ( $\Delta G^0_{N-U}$ ), parámetro termodinámico que caracteriza la estabilidad de proteínas en solución.

### 4.2.2 Reconstitución de rHDL conteniendo apoA-I

La reconstitución de lipoproteínas conteniendo apoA-I, consiste en la generación, en forma controlada, de rHDL. Esta herramienta es utilizada como criterio de actividad biológica y de caracterización estructural en variantes mutantes de apoA-I. Existen dos metodologías para generar rHDL: reconstitución por diálisis con colato y por microsolubilización directa en la temperatura de transición de fase del lípido de interés [129].

#### 4.2.2.1 Reconstitución por diálisis con colato

A continuación, se describe la metodología utilizada para generar *in vitro* partículas de rHDL por el método de diálisis con colato. Brevemente, el fundamento de la técnica consiste en los siguientes pasos:

- 1) Preparación de MLV o LUV del fosfolípido de interés. El procedimiento es igual al desarrollado en la obtención de vesículas LUV (**Sección 4.1.9**).
- 2) Generación de micelas del tamaño de las rHDL de interés. Estas se logran por combinación del fosfolípido de interés con colato de sodio en la proporción adecuada. Relaciones en moles de (fosfolípido:apoA-I:colato), de (35:1:80) y (95:1:150) generan poblaciones de rHDL de diámetro aproximado de 7,8 nm y 9,6 nm, respectivamente.
- 3) Incubación de las micelas generadas con apoA-I. En esta etapa se generan los complejos de rHDL. Luego se elimina el colato para obtener las rHDL libres del detergente.

De esta manera, se puede generar rHDL con el fosfolípido de interés y de un tamaño determinado que queda definido por la relación entre los tres componentes de la mezcla: fosfolípido, proteína y colato de sodio.

El protocolo utilizado para generar rHDL inicia con la preparación de MLV en buffer TBSE a pH 7,4 descrito en la sección de obtención de LUV (**Sección 4.1.9**). Opcionalmente, se puede extrusar la solución de LUV en un extrusor Liposofast (Avestin, Canada) con filtros de 100 nm de diámetro. Una vez obtenidas MLV (o LUV), se prepara una mezcla entre estas y una solución de colato de sodio disuelta en buffer TBSE a pH 7,4 según la proporción que se necesite. Luego la mezcla se deja reposar en hielo durante 1 hs. En esta etapa tenemos micelas del fosfolípido de interés con colato de sodio. Finalmente, la proteína previamente dializada en buffer TBSE se mezcla con la solución de micelas, se deja incubar sin agitación en hielo durante 30 min adicionales y luego la mezcla resultante se dializa en buffer TBSE toda la noche, para así eliminar el colato de sodio. En este paso final se logra obtener una solución de partículas de rHDL del tamaño de interés. Para corroborar el tamaño promedio y la polidispersidad de las rHDL generadas, estas se corren en geles de poliacrilamida en gradiente 8-25 % en condiciones nativas (sin SDS ni BME).

#### **4.2.2.2 Reconstitución por microsolubilización directa**

A continuación, se describe la metodología utilizada para generar partículas de rHDL por el método de microsolubilización directa en la temperatura de transición de fase del lípido de interés, en nuestro caso DMPC. Este método solo se puede llevar a cabo con fosfolípidos que posean una temperatura de transición de fase conocida y manejable en el laboratorio, en esta situación el DMPC es ideal ya que el mismo posee una temperatura de transición de fase de 24 °C. Brevemente, el fundamento de la técnica consiste en los siguientes pasos:

- 1) Preparación de MLV (o LUV) del fosfolípido de interés. Aunque con LUV se mejora la polidispersidad de las rHDL resultantes y los tiempos de solubilización son menores.

2) Incubación a la temperatura de transición de fase. Los lípidos a esta temperatura generan imperfecciones en su estructura donde apoA-I puede estabilizar estas, de esta manera, formando rHDL. Se puede trabajar en dos relaciones de fosfolípido:apoA-I: (35:1) → 7,8 nm o (80:1) → 9,6 nm, aunque la primera es poco eficiente.

El protocolo para la preparación de estas partículas es equivalente al protocolo de generación de partículas por diálisis con colato. Se preparan MLV (o LUV) del fosfolípido de interés, en este caso de DMPC, de la misma forma en que se describió en el apartado anterior, y se incuba con cantidad suficiente de proteína, según la relación deseada durante 24 hs a 24 °C. Por último, el tamaño y polidispersidad de estas partículas se corrobora por gel en gradiente 8-25 % en condiciones nativas.

### 4.2.3 Obtención de espectros de emisión de pireno

A continuación, se describen las condiciones utilizadas para registrar los espectros de emisión de fluorescencia en los experimentos de oligomerización de mutantes de apoA-I marcadas con pireno. En primer lugar, se dializa solución de proteína (previamente concentrada), en buffer PBS a pH 7,4 durante toda la noche. Al día siguiente, la solución es centrifugada a 10000 rpm durante 10 min y el sobrenadante es trasvasado a otro tubo limpio. Las concentraciones de proteína y de pireno son determinadas por BCA y  $A_{343\text{ nm}}$ , respectivamente, determinándose el grado de marcación de la muestra. Luego se preparan distintas diluciones de la misma a distintas concentraciones totales de proteína, dejando incubar durante al menos 2 hs a 25 °C. Finalmente, se adquieren espectros de emisión de fluorescencia del pireno desde la muestra más diluida a la más concentrada (en este orden), incluyendo el buffer PBS. Esta adquisición se realiza en un espectrofluorometro SLM4800 actualizado por Olis (ISS Inc., Champaign, IL). Las condiciones generales de adquisición fueron: longitud de onda de excitación a 345 nm, rango de emisión colectado entre 350 y 650 nm cada un nanómetro, ventanas de excitación y emisión de 4/4, y un tiempo de integración de 0,25 seg por cada longitud de onda recogida. Se registran tres (3) espectros a cada concentración y se promedian. Además, sobre las mismas muestras se registran los espectros de absorbancias (espectrofotómetro Agilent 8453 UV visible), en aquellas con valores entre 0,1 y 1 unidades arbitrarias, extrapolando así la absorbancia de las muestras restantes.

### 4.2.3.1 Corrección de espectros de pireno

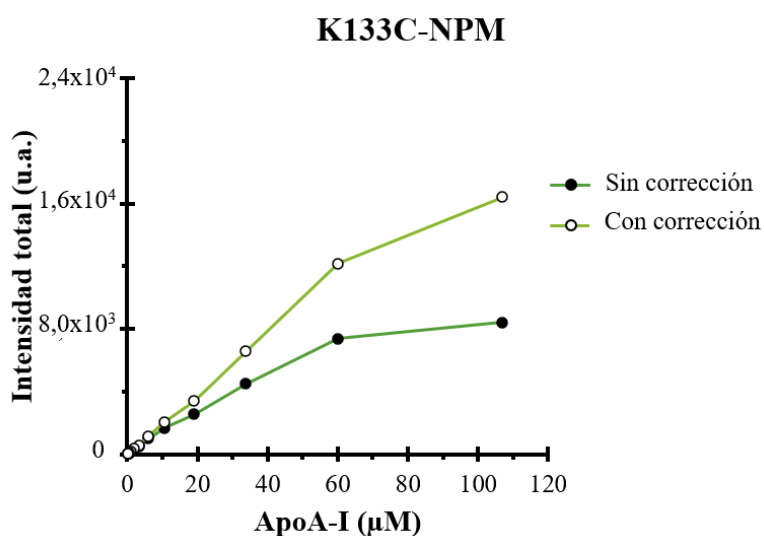
Para eliminar la contribución de fluorescencia del buffer, por efecto Raman del solvente, y la disminución de la intensidad total de fluorescencia por filtro interno, los espectros de emisión de fluorescencia se corrigen de la siguiente manera:

- 1) Estos se corrigen por efecto Raman mediante la diferencia de cada espectro medido por la del buffer en ausencia de proteína, medido en las mismas condiciones.
- 2) La corrección por filtro interno se logra haciendo uso de los espectros de absorbancia medidos en cada muestra. La corrección se realiza siguiendo la **Ecuación 4**:

$$F_{c(\lambda_{emi})} = F_{s(\lambda_{emi})} \cdot 10^{\left(\frac{A_{(\lambda_{exi})} \cdot po1 + A_{(\lambda_{emi})} \cdot po2}{2}\right)} \quad (4)$$

dónde  $F_{c(\lambda_{emi})}$  es fluorescencia corregida;  $F_{s(\lambda_{emi})}$  la fluorescencia sin corregir;  $A_{(\lambda_{exi})}$  la absorbancia a la longitud de onda de excitación;  $A_{(\lambda_{emi})}$  la absorbancia a la longitud de onda de emisión; **po1** el paso óptico de excitación sobre la muestra; y **po2** el paso óptico de absorción sobre la muestra. Estos dos últimos fueron de 0,2 y 1 cm, respectivamente. Un ejemplo de esta corrección se muestra en la

**Figura 4.1.**



**Figura 4.1: Efecto de filtro interno sobre apoA-I marcada con pireno.** A modo de ejemplo se muestra una corrección con la mutante K133C.

#### 4.2.3.2 Deconvolución de espectros

Las propiedades fluorescentes de la sonda pireno son útiles para registrar cambios de polaridad y proximidad en proteínas marcadas. Sin embargo, extraer fielmente dicha información de estos espectros multicomponentes para propósitos cuantitativos fue y sigue siendo un desafío, especialmente la información referida a los cambios de polaridad registrados por P-value. Aquí proponemos un método de deconvolución espectral para espectros de emisión de fluorescencia de la sonda pireno unida en proteínas, en entornos acuosos, con presencia de ambos fenómenos: cambios de P-value y formación de excímero (ver **Sección 2.5.3**).

Los espectros de emisión de fluorescencia para este análisis deben ser previamente corregidos y normalizados por sus intensidades totales de fluorescencia. El análisis por deconvolución se enfoca en cuatro intensidades o ventanas de emisión: 376 nm (pI), 384 nm (pIII), 395 nm (pIV o pM), y 460 nm (pE), que en nuestras condiciones de medida fueron las comúnmente visibles, evaluando la presencia de otras bandas de emisión que pueden o no estar presentes dependiendo de las condiciones de medida, por ejemplo: la polaridad del microentorno alrededor del pireno y la sensibilidad del equipo.

El método de deconvolución radica fundamentalmente de una descomposición de espectros en la suma individual de sus componentes, descritos matemáticamente mediante distintos tipos de distribuciones. La elección de la cantidad total y del tipo de distribución son cruciales ya que estas dependen del tipo de sonda fluorescente, el entorno alrededor de esta, sea acuoso u orgánico, y las condiciones experimentales en las cuales se llevó a cabo la adquisición de estos espectros. Existen dos distribuciones comúnmente utilizadas para describir la señal de emisión de fluorescencia en proteínas: distribuciones Gaussianas y de tipo Log:

1) La distribución Gaussiana es definida por tres parámetros:  $\mu$  (media),  $\sigma$  (varianza) y **Amp** (amplitud) siendo su característica más importante la de ser simétrica, distribuyendo la señal de fluorescencia equitativamente alrededor del máximo de emisión (**Ecuación 5**) [171].

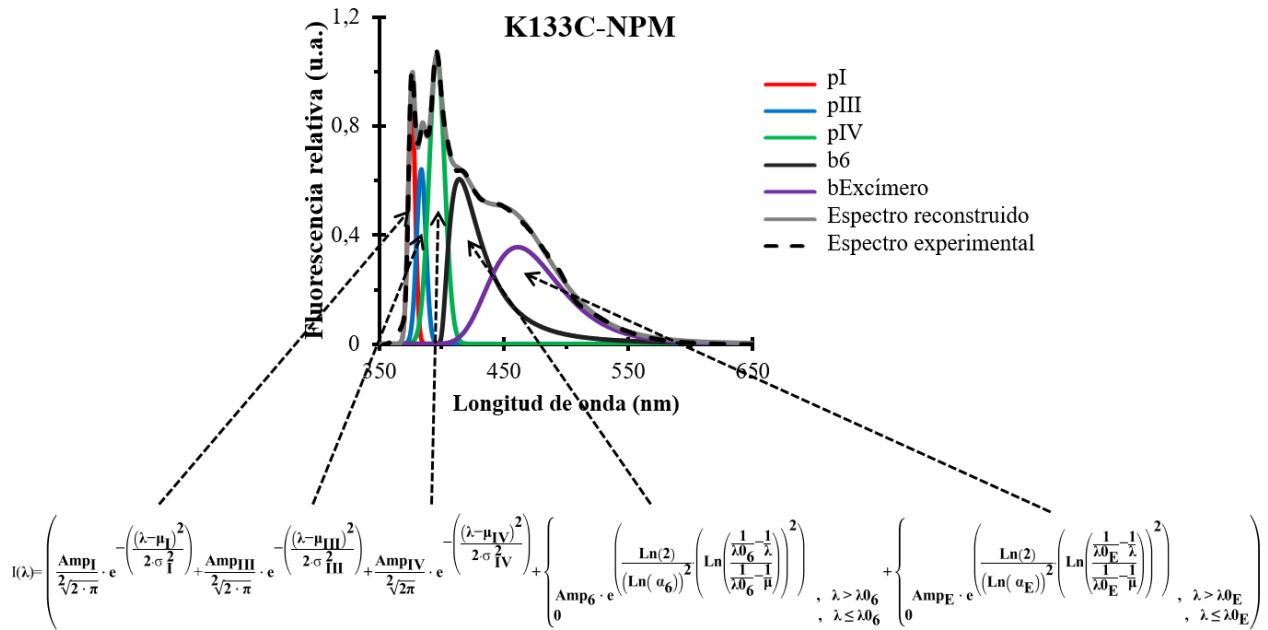
$$I(\lambda) = \frac{\text{Amp}}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\left(\frac{\lambda-\mu}{2 \cdot \sigma^2}\right)^2} \quad (5)$$

2) La distribución Log ha sido propuesta como la función que describe apropiadamente la forma de espectros de emisión de fluorescencia en moléculas complejas (**Ecuación 6**) [171,172]. Esta es definida por cuatro (4) parámetros:  $\mu$  (media),  $\alpha$  (asimetría), **Amp** (amplitud) y  $\lambda_0$  (punto de inicio), teniendo esta la particularidad de ser asimétrica distribuyendo la señal de fluorescencia preferencialmente hacia un lado o el otro del máximo de emisión de fluorescencia.

$$I(\lambda) = \begin{cases} \text{Amp} \cdot e^{\left(\frac{\text{Ln}(2)}{(\text{Ln}(\alpha))^2} \left(\text{Ln}\left(\frac{1-\frac{1}{\lambda}}{\frac{1}{\lambda_0}-\frac{1}{\mu}}\right)\right)^2\right)}, & \lambda > \lambda_0 \\ 0, & \lambda \leq \lambda_0 \end{cases} \quad (6)$$

La cantidad de distribuciones elegidas se realiza teniendo en cuenta la cantidad total de bandas observables en nuestros espectros de emisión, que depende de las condiciones de adquisición de espectros, eligiéndose una cantidad de cinco (5), cuando hay emisión del excímero y cuatro (4) cuando esta no se presenta. Es así que cada espectro de emisión de fluorescencia se ajustó a un conjunto de cinco (5) distribuciones, tres (3) distribuciones Gaussianas y dos (2) tipo Log, en caso de que haya formación de excímero, en caso contrario se utilizan solamente una. En la **Figura 4.2** se muestra a modo de ejemplo un espectro de emisión de fluorescencia para una mutante de Cys marcada con pireno, que tiene la capacidad de formar excímeros, donde se puede apreciar el resultado final de la deconvolución espectral.



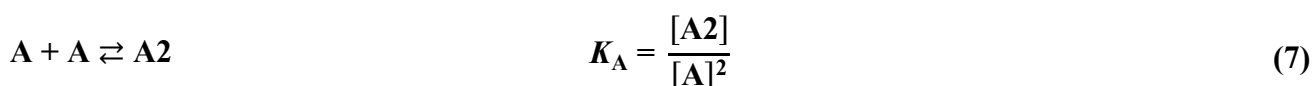


**Figura 4.2: Deconvolución espectral.** Ejemplo de una deconvolución espectral para 5 componentes con K133C-NPM. En cada espectro, los componentes se muestran en diferentes colores: pI (rojo), pIII (azul), pIV (verde), b6 (negro), bExcímero (violeta), espectro reconstruido (gris), espectro experimental (línea negra discontinua).

### 4.3 Desarrollo de modelos matemáticos de asociación de apoA-I

#### 4.3.1 Equilibrio único para cambios en la relación E/M

El proceso de asociación en apoA-I puede representarse con el siguiente equilibrio (Ecuación 7):



donde se puede definir una constante de asociación ( $K_A$ ).

A partir de un espectro típico de emisión de fluorescencia del pireno, la fluorescencia a cada longitud de onda puede representarse como la suma de sus contribuciones, pura y *bleedthrough*. Si aplicamos esta definición a las fluorescencias del monómero (**Fm**) y excímero (**Fd**) de pireno, podemos definir las siguientes ecuaciones generales (Ecuaciones 8 y 9):

$$F_m = Y_m \cdot [A] + Y'_d \cdot [A_2] \quad (8)$$

$$F_d = Y'_m \cdot [A] + Y_d \cdot [A_2] \quad (9)$$

donde  $[A]$  y  $[A_2]$  son las concentraciones de las especies monoméricas y diméricas;  $Y_m$ ,  $Y_d$ ,  $Y'_m$  y  $Y'_d$  son las fluorescencias específicas del monómero y del dímero en sus formas pura y *bleedthrough* ( $Y$  y  $Y'$ ), respectivamente.

Ya que estamos trabajando con una proteína marcada con una sonda fluorescente, se consideró el grado de marcación ( $g$ ), para de esta manera estimar la ocupación de monómeros marcados dentro de distintas especies oligoméricas de acuerdo con su distribución aleatoria. Para un equilibrio  $2A \rightleftharpoons A_2$ , estas distribuciones son representadas en las Ecuaciones 10 y 11:

$$[A] = g \cdot [A] + (1-g) \cdot [A] \quad (10)$$

$$[A_2] = g^2 \cdot [A_2] + 2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A_2] + (1-g)^2 \cdot [A_2] \quad (11)$$

donde los últimos componentes, en cada una, no son capaces de emitir fluorescencia y por lo tanto fueron omitidos en el desarrollo. Por otro lado, la fracción  $2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A_2]$  solo puede emitir como monómero.

Utilizando estas definiciones en las **Ecuaciones 8 y 9**, y considerando que la fluorescencia del monómero no cambia durante la asociación, se obtuvieron las **Ecuaciones 12 y 13**:

$$F_m = Y_m \cdot (g \cdot [A]) + Y'_d \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + Y_m \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A_2]) \quad (12)$$

$$F_d = Y'_m \cdot (g \cdot [A]) + Y_d \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + Y'_m \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A_2]) \quad (13)$$

Además, teniendo en cuenta aquellos factores que pueden afectar la formación del excímero, se pueden englobar estos en un parámetro que denominamos eficiencia de la formación de excímero **h<sub>2</sub>**, que toma valores entre 0 y 1, aplicable solo a la especie  $g^2 \cdot [A_2]$ . Considerando este parámetro, la fluorescencia de esta especie se puede presentar de la siguiente forma (**Ecuaciones 14 y 15**):

$$F_d(g^2 \cdot [A_2]) = h_2 \cdot Y_d \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + (1-h_2) \cdot (2 \cdot Y'_m) \cdot (g^2 \cdot [A_2]) \quad (14)$$

$$F'_d(g^2 \cdot [A_2]) = h_2 \cdot Y'_d \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + (1-h_2) \cdot (2 \cdot Y_m) \cdot (g^2 \cdot [A_2]) \quad (15)$$

donde los parámetros **Y<sub>m</sub>** y **Y'<sub>m</sub>** son expresados como fluorescencia por unidad de pireno y **Y<sub>d</sub>** y **Y'<sub>d</sub>** por unidad de excímero (dímero).

De esta manera, si realizamos la relación de fluorescencia entre todas las especies que emiten como excímero y monómero (**Ecuaciones 12 y 13**), y considerando las **Ecuaciones 14 y 15**, obtenemos la **Ecuación 16**:

$$\frac{F_d}{F_m} = \frac{h_2 \cdot Y_d \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + (1-h_2) \cdot (2 \cdot Y'_m) \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + Y'_m \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A_2]) + Y'_m \cdot (g \cdot [A])}{h_2 \cdot Y'_d \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + (1-h_2) \cdot (2 \cdot Y_m) \cdot (g^2 \cdot [A_2]) + Y_m \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A_2]) + Y_m \cdot (g \cdot [A])} \quad (16)$$

Finalmente, cuando la **Ecuación 16** se combina con la solución positiva de las ecuaciones de balance de masa ( $[At] = [A] + 2 \cdot [A_2]$ ) y la definición de la constante de asociación (**Ecuación 7**), y simplificando esta, obtenemos un ecuación general (**Ecuación 17**), que es función de la concentración total de proteína ( $[At]$ ):

$$\frac{F_d}{F_m}([At]) = \frac{g \cdot h_2 \cdot (-1 - 4 \cdot [At] \cdot K_A + \sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}) \cdot (Y_d - 2 \cdot Y'_m) - 8 \cdot [At] \cdot K_A \cdot Y'_m}{g \cdot h_2 \cdot (-1 - 4 \cdot [At] \cdot K_A + \sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}) \cdot (Y'_d - 2 \cdot Y_m) - 8 \cdot [At] \cdot K_A \cdot Y_m} + c_1 \quad (17)$$

donde  $c_1$  es una constante que contiene todas aquellas discrepancias en las aproximaciones que se hicieron.

Suponiendo que el *bleedthrough* del excímero ( $Y'_d$ ) es despreciable (por la forma de los picos IV y E), podemos simplificar este último modelo al eliminar esta contribución. De esta manera, el modelo final para espectros sin deconvolucionar queda de la siguiente forma (**Ecuación 18**):

$$\frac{F_d}{F_m}([At]) = \frac{g \cdot h_2 \cdot (-1 - 4 \cdot [At] \cdot K_A + \sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}) \cdot (Y_d - 2 \cdot Y'_m) - 8 \cdot [At] \cdot K_A \cdot Y'_m}{g \cdot h_2 \cdot (-1 - 4 \cdot [At] \cdot K_A + \sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}) \cdot (2 \cdot Y_m) - 8 \cdot [At] \cdot K_A \cdot Y_m} + c_1 \quad (18)$$

Por otro lado, cuando se trabaja con espectros deconvolucionados, se elimina el componente  $Y'_m$ , restando un parámetro más al modelo.

### 4.3.2 Equilibrio único para cambios en P-value

El desarrollo de un modelo para cambios en P-value siguió el mismo procedimiento que el desarrollado en la sección anterior.

Las intensidades de fluorescencia máximas de los picos I y III (**FpI** y **FpIII**) se representan como una suma de contribuciones puras y *bleedthrough* (**Ecuaciones 19 y 20**):

$$F_{pI} = Y_{pIA} \cdot [A] + Y_{pIA2} \cdot [A2] + Y_{pIII'A} \cdot [A] + Y_{pIII'A2} \cdot [A2] \quad (19)$$

$$F_{pIII} = Y_{pIIIA} \cdot [A] + Y_{pIIIA2} \cdot [A2] + Y_{pI'A} \cdot [A] + Y_{pI'A2} \cdot [A2] \quad (20)$$

donde no se tuvo en cuenta la formación del excímero de pireno. Los parámetros **YpIA**, **YpIIIA**, **YpIA2**, **YpIIIA2** y **YpI'A**, **YpIII'A**, **YpI'A2**, **Y'pIII'A2** son las señales de fluorescencia específicas (**Y**) y sus interferencias (**Y'**), respectivamente.

Considerando una distribución aleatoria entre la proteína marcada y no marcada (**Ecuaciones 10 y 11**), obtenemos las **Ecuaciones 21 y 22**:

$$F_{pI} = Y_{pIA} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pIA2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pIA2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) + Y'_{pIIIA} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pIII'A2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pIII'A2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) \quad (21)$$

$$F_{pIII} = Y_{pIIIA} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pIIIA2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pIIIA2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) + Y'_{pIA} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pI'A2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pI'A2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) \quad (22)$$

donde también la fluorescencia del monómero en especies diméricas con dos moléculas de pireno la expresamos por unidad.

Realizando la relación entre las señales de los picos I y III, según la definición de P-value, obtenemos la **Ecuación 23**:

$$\begin{aligned}
 F_{pI}/F_{pIII} = & (Y_{pIA} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pIA2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pIA2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) + \\
 & Y'_{pIII A} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pIII' A2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pIII' A2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2])) / \\
 & (Y_{pIII A} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pIII A2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pIII A2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) + \\
 & Y'_{pIA} \cdot (g \cdot [A]) + (2 \cdot Y_{pI' A2}) \cdot (g^2 \cdot [A2]) + Y_{pI' A2} \cdot (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]))
 \end{aligned} \tag{23}$$

Si simplificamos esta ecuación, obtenemos una forma reducida de esta que no depende del grado de marcación **g** (**Ecuación 24**):

$$P\text{-value} = \frac{(Y_{pIA} + Y_{pIII' A}) \cdot [A] + (Y_{pIA2} + Y_{pIII' A2}) \cdot 2 \cdot [A2]}{(Y_{pIII A} + Y_{pI' A}) \cdot [A] + (Y_{pIII A2} + Y_{pI' A2}) \cdot 2 \cdot [A2]} \tag{24}$$

Como describimos previamente, al combinar la solución positiva del sistema de dos ecuaciones planteado en la sección anterior (balance de masas y definición de  $K_A$ ), obtenemos la **Ecuación 25**, que utilizamos como modelo para ajustar los cambios en P-value.

$$P\text{-value}([At]) = \frac{(Y_{pIA} + Y_{pIII' A}) \cdot \left( \frac{-1 + \sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}}{4 \cdot K_A} \right) + (Y_{pIA2} + Y_{pIII' A2}) \cdot 2 \cdot \left( \frac{1}{8} \cdot \left( 4 \cdot [At] + \frac{1}{K_A} - \frac{\sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}}{K_A} \right) \right)}{(Y_{pIII A} + Y_{pI' A}) \cdot \left( \frac{-1 + \sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}}{4 \cdot K_A} \right) + (Y_{pIII A2} + Y_{pI' A2}) \cdot 2 \cdot \left( \frac{1}{8} \cdot \left( 4 \cdot [At] + \frac{1}{K_A} - \frac{\sqrt{1 + 8 \cdot [At] \cdot K_A}}{K_A} \right) \right)} + c2 \tag{25}$$

donde **c2** es una constante que contiene todas aquellas discrepancias en las aproximaciones realizadas. Cabe recalcar que se llega al mismo modelo si consideramos una formación de excímero, a través de un **h2** y fluorescencias específicas *bleedthrough* **Y'd** en los picos I y III despreciables, que es el caso nuestro a partir de la separación de los picos **pI** y **pIII** de la fluorescencia de excímero. Finalmente, si se trabaja con espectros corregidos y deconvolucionados el *bleedthrough* en la **Ecuación 25** se elimina (parámetros, **YpI'A**, **YpIII'A**, **YpI'A2** y **YpIII'A**).

### 4.3.3 Equilibrios múltiples para cambios en la relación E/M y P-value, modelo

#### M1

Los lineamientos generales del desarrollo de modelos de asociación múltiple son equivalentes a los planteados en la sección previa. A continuación, se muestra el desarrollo para un modelo de asociación secuencial progresiva (M1), desarrollado con el software *Wolfram Mathematica* 11.3., que es equivalente a otros modelos de asociación, a través del cual se pretende llegar a una expresión matemática que reproduzca el comportamiento de las distintas señales de fluorescencia del pireno: pI, pIII, pIV (monómero) y pE (excímero) en función de la concentración total de proteína ([At]). El modelo desarrollado para analizar estas señales se fundamenta en las siguientes suposiciones:

- 1) Los equilibrios de asociación se pueden representar con las siguientes reacciones:



en las cuales A, A<sub>2</sub>, A<sub>4</sub> y A<sub>8</sub> corresponden a las distintas especies oligoméricas (monómero, dímero, tetrámero y octámero) y, por lo tanto, las constantes de asociación ( $K_A$ ) se pueden definir de la siguiente forma (**Ecuaciones 26, 27 y 28**):

$$K_{A1} = \frac{[A_2]}{[A]^2} \quad (26)$$

$$K_{A2} = \frac{[A_4]}{[A_2]^2} \quad (27)$$

$$K_{A3} = \frac{[A_8]}{[A_4]^2} \quad (28)$$

donde [A], [A<sub>2</sub>], [A<sub>4</sub>] y [A<sub>8</sub>] son las concentraciones de las distintas especies.

2) Conociendo que la suma total de especies es un valor conocido, se plantea una ecuación adicional que representa la conservación de masas (**Ecuación 29**).

$$[At] = [A] + 2 \cdot [A2] + 4 \cdot [A4] + 8 \cdot [A8] \quad (29)$$

en la cual [At] es la concentración total de proteína.

3) Ya que los ensayos se realizan con proteína marcada con una sonda fluorescente, y sabiendo que el grado de marcación alcanzado es inferior al 100 %, la marca fluorescente estará distribuida entre distintas sub-especies de la siguiente forma (**Ecuaciones 30, 31, 32 y 33**):

$$[A] = (g \cdot [A]) + ((1-g) \cdot [A]) \quad (30)$$

$$[A2] = (g^2 \cdot [A2]) + (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) + ((1-g)^2 \cdot [A2]) \quad (31)$$

$$[A4] = (g^4 \cdot [A4]) + (4 \cdot g^3 \cdot (1-g) \cdot [A4]) + (6 \cdot g^2 \cdot (1-g)^2 \cdot [A4]) + (4 \cdot g \cdot (1-g)^3 \cdot [A4]) + ((1-g)^4 \cdot [A4]) \quad (32)$$

$$[A8] = (g^8 \cdot [A8]) + (8 \cdot g^7 \cdot (1-g) \cdot [A8]) + (28 \cdot g^6 \cdot (1-g)^2 \cdot [A8]) + (56 \cdot g^5 \cdot (1-g)^3 \cdot [A8]) + (70 \cdot g^4 \cdot (1-g)^4 \cdot [A8]) + (56 \cdot g^3 \cdot (1-g)^5 \cdot [A8]) + (28 \cdot g^2 \cdot (1-g)^6 \cdot [A8]) + (8 \cdot g \cdot (1-g)^7 \cdot [A8]) + ((1-g)^8 \cdot [A8]) \quad (33)$$

donde g es el grado de marcación tomando valores entre 0 y 1.

4) Ya que solo podemos medir sub-especies con capacidad de emitir fluorescencia, los términos correspondientes a aquellas que no lo hacen se descartan ya que al asignarles una fluorescencia específica nula estas desaparecerían. A saber:



$$(1-g) \cdot [A]$$

$$(1-g)^2 \cdot [A_2]$$

$$(1-g)^4 \cdot [A_4]$$

$$(1-g)^8 \cdot [A_8]$$

De esta manera, podemos definir las concentraciones de las distintas especies marcadas ( $[A]_M$ ,  $[A_2]_M$ ,  $[A_4]_M$ , y  $[A_8]_M$ ) como una suma de fracciones ( $f_{nM}(j)$ ) en función del número de moléculas de pireno en cada sub-especie ( $j$ ) y del número de sub-unidades ( $n$ ) en cada oligómero (**Ecuaciones 34, 35, 36 y 37**):

$$[A]_M = \sum_{j=1}^{j=1} f_{A_M(j)} \cdot [A] = (g \cdot [A]) \quad (34)$$

$$[A2]_M = \sum_{j=1}^{j=2} f_{A2_M(j)} \cdot [A2] = (g^2 \cdot [A2]) + (2 \cdot g \cdot (1-g) \cdot [A2]) \quad (35)$$

$$[A4]_M = \sum_{j=1}^{j=4} f_{A4_M(j)} \cdot [A4] = (g^4 \cdot [A4]) + (4 \cdot g^3 \cdot (1-g) \cdot [A4]) + (6 \cdot g^2 \cdot (1-g)^2 \cdot [A4]) + (4 \cdot g \cdot (1-g)^3 \cdot [A4]) \quad (36)$$

$$[A8]_M = \sum_{j=1}^{j=8} f_{A8_M(j)} \cdot [A8] = (g^8 \cdot [A8]) + (8 \cdot g^7 \cdot (1-g) \cdot [A8]) + (28 \cdot g^6 \cdot (1-g)^2 \cdot [A8]) + (56 \cdot g^5 \cdot (1-g)^3 \cdot [A8]) + (70 \cdot g^4 \cdot (1-g)^4 \cdot [A8]) + (56 \cdot g^3 \cdot (1-g)^5 \cdot [A8]) + (28 \cdot g^2 \cdot (1-g)^6 \cdot [A8]) + (8 \cdot g \cdot (1-g)^7 \cdot [A8]) \quad (37)$$

donde  $[A]_M$ ,  $[A2]_M$ ,  $[A4]_M$  y  $[A8]_M$  corresponden a las concentraciones de proteínas marcadas de cada especie.

Si agrupamos las **Ecuaciones 34, 35, 36 y 37** en una única ecuación general, obtenemos la **Ecuación 38** en función del número de sub-unidades totales (**n**) y de aquellas marcadas con pireno (**j**) en un oligómero, respectivamente. En esta ecuación, **n** toma valores discretos de 1, 2, 4 y 8, mientras que **j** valores consecutivos entre 1 y **n**.

$$[At]_M = \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=8} f_{An_M(j)} \cdot [An] \quad (38)$$

La **Tabla 4.1** ordena todas estas fracciones ( $f_{An_M(j)}$ ) en función de **n** y **j**, y su capacidad de formar dímeros, excímeros en nuestro caso, para **n > 2**:

Tabla 4.1: Distribución  $f_{An_M(j)}$  para  $n$  y  $j$ 

$j \backslash n$	1	2	4	8
1	$g$	$2 \cdot g \cdot (1-g)$	$4 \cdot g \cdot (1-g)^3$	$8 \cdot g \cdot (1-g)^7$
2		$g^2$	$6 \cdot g^2 \cdot (1-g)^2$	$28 \cdot g^2 \cdot (1-g)^6$
3			$4 \cdot g^3 \cdot (1-g)$	$56 \cdot g^3 \cdot (1-g)^5$
4			$g^4$	$70 \cdot g^4 \cdot (1-g)^4$
5				$56 \cdot g^5 \cdot (1-g)^3$
6				$28 \cdot g^6 \cdot (1-g)^2$
7				$8 \cdot g^7 \cdot (1-g)$
8				$g^8$

Se representan las fracciones de especies oligoméricas en función de  $n$  y  $j$  (sub-unidades totales en un determinado oligómero y aquellas marcadas con una sonda, en nuestro caso pireno). El modelo utilizado corresponde a un modelo de asociación secuencial progresiva (M1). En azul se representan aquellas fracciones que emiten como monómero mientras que en verde aquellas que pueden emitir en forma de monómero y dímero dependiendo de su valor de fluorescencia de formación de excímero ( $hn$ , ver más adelante).

5) La señal de fluorescencia a cada longitud de onda se puede representar como una suma de contribuciones de cada especie presente en la muestra. De este modo, cada ventana del espectro puede considerarse como una suma de contribuciones de señales puras (provenientes de los picos de emisión centrados a dicha longitud de onda) y de señales de *bleedthrough* (de los picos cercanos).

En particular, nos interesan cuatro (4) rangos de longitudes de onda correspondientes a los picos pI, pIII, pIV (monómero) y pE (excímero) del pireno, donde para simplificar se obvió el *bleedthrough* del pIV en pI y pIII, y viceversa. Para facilitar la visualización, las distintas contribuciones a la fluorescencia total registrada se agruparon de la siguiente manera:

$$F_{pI} = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIA_n} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIII'A_n} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{j=2}^{j=n} \sum_{n=2}^{n=8} (Y_{dpI'A_n(j)}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \quad (39)$$

$$F_{pIII} = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIIIAn} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pI'A_n} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{j=2}^{j=n} \sum_{n=2}^{n=8} (Y_{dpIII'A_n(j)}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \quad (40)$$

$$F_m = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{mAn} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{j=2}^{j=n} \sum_{n=2}^{n=8} (Y_{d'A_n(j)}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \quad (41)$$

$$F_e = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{m'A_n} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{j=2}^{j=n} \sum_{n=2}^{n=8} (Y_{dAn(j)}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \quad (42)$$

donde **FpI**, **FpIII**, **Fm** y **Fe** son las fluorescencias totales registrables en los picos pI, pIII, pIV y pE, respetivamente. **YpIAN**, **YpIIIAn**, **YmAn**, **YdAn(j)** y **YpIII'A<sub>n</sub>**, **YdpI'A<sub>n</sub>(j)**, **YpI'A<sub>n</sub>**, **YdpIII'A<sub>n</sub>(j)**, **Yd'A<sub>n</sub>(j)** **Ym'A<sub>n</sub>** son las fluorescencias específicas para cada pico de emisión del pireno, evaluado en **n** y **j**, diferenciando la señal pura del mismo (**Y**) y del *bleedthrough* de los picos cercanos (**Y'**), para la serie de sub-especies existentes.

En las expresiones **FpI**, **FpIII**, **pM** y **pE**, la primera sumatoria corresponde a todas aquellas sub-especies con una única unidad de pireno y por lo tanto emiten sólo como monómero (**Tabla 4.1**, celdas en color azul). En **FpI**, **FpIII**, la segunda sumatoria corresponde a las mismas sub-especies, pero considerando el *bleedthrough* de emisión de los picos cercanos (pI o pIII). Finalmente, en **FpI**, **FpIII**, **pM** y **pE**, la última sumatoria corresponde a todas aquellas sub-especies que poseen dos o más unidades de pireno y no se conoce con qué fluorescencia emiten, como monómero o excímero de pireno (**Tabla 4.1**, celdas en color verde). Esta fue diferenciada del resto con la letra **d**, que hace referencia a dímero. Como su fluorescencia depende de la eficiencia de formación de excímeros, esta depende de varios factores.

6) Si suponemos una eficiencia de formación de excímero global (**hn**) para cada especie que participa de los equilibrios de oligomerización (fluorescencias **Yd** en cada ventana de emisión, **Ecuaciones 39, 40, 41 y 42**) los términos **YdI'An(j)**, **YdIII'An(j)**, **Yd'An(j)** y **YdAn(j)** se desarrollan en función de **j** y **n** en la **Tabla 4.2**.

**Tabla 4.2: Distribución de fluorescencia considerando  $hn$  y  $j$**

$YAn(j)$	$An$	$j$	Distribución de fluorescencia
	A2	2	$h2 \cdot YepI' A2 + (1-h2) \cdot (2 \cdot YpIA2) + (1-h2) \cdot (2 \cdot YpIII' A2)$
		2	$h4 \cdot YepI' A4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpIA4) + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpIII' A4)$
	A4	3	$h4 \cdot YepI' A4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpIA4) + YpIA4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpIII' A4) + YpIII' A4$
		4	$h4 \cdot 2 \cdot YepI' A4 + (1-h4) \cdot (4 \cdot YpIA4) + (1-h4) \cdot (4 \cdot YpIII' A4)$
YdpI'An(j)	A8	2	$h8 \cdot YepI' A8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpIA8) + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpIII' A8)$
		3	$h8 \cdot YepI' A8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpIA8) + YpIA8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpIII' A8) + YpIII' A8$
	4	$h8 \cdot 2 \cdot YepI' A8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpIA8) + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpIII' A8)$	
	5	$h8 \cdot 2 \cdot YepI' A8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpIA8) + YpIA8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpIII' A8) + YpIII' A8$	
	6	$h8 \cdot 3 \cdot YepI' A8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpIA8) + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpIII' A8)$	
	7	$h8 \cdot 3 \cdot YepI' A8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpIA8) + YpIA8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpIII' A8) + YpIII' A8$	
	A2	2	$h2 \cdot YepIII' A2 + (1-h2) \cdot (2 \cdot YpIIIA2) + (1-h2) \cdot (2 \cdot YpI' A2)$
		2	$h4 \cdot YepIII' A4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpIIIA4) + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpI' A4)$
	A4	3	$h4 \cdot YepIII' A4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpIIIA4) + YpIIIA4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YpI' A4) + YpI' A4$
		4	$h4 \cdot 2 \cdot YepIII' A4 + (1-h4) \cdot (4 \cdot YpIIIA4) + (1-h4) \cdot (4 \cdot YpI' A4)$
YdpIII'An(j)	A8	2	$h8 \cdot YepIII' A8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpIIIA8) + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpI' A8)$
		3	$h8 \cdot YepIII' A8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpIIIA8) + YpIIIA8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YpI' A8) + YpI' A8$
	4	$h8 \cdot 2 \cdot YepIII' A8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpIIIA8) + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpI' A8)$	
	5	$h8 \cdot 2 \cdot YepIII' A8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpIIIA8) + YpIIIA8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YpI' A8) + YpI' A8$	
	6	$h8 \cdot 3 \cdot YepIII' A8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpIIIA8) + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpI' A8)$	
	7	$h8 \cdot 3 \cdot YepIII' A8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpIIIA8) + YpIIIA8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YpI' A8) + YpI' A8$	
	A2	2	$h2 \cdot Ye' A2 + (1-h2) \cdot (2 \cdot YmA2)$
		2	$h4 \cdot Ye' A4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YmA4)$
	A4	3	$h4 \cdot Ye' A4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot YmA4) + YmA4$
		4	$h4 \cdot 2 \cdot Ye' A4 + (1-h4) \cdot (4 \cdot YmA4)$
Yd'An(j)	A8	2	$h8 \cdot Ye' A8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YmA8)$
		3	$h8 \cdot Ye' A8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot YmA8) + YmA8$
	4	$h8 \cdot 2 \cdot Ye' A8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YmA8)$	
	5	$h8 \cdot 2 \cdot Ye' A8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot YmA8) + YmA8$	
	6	$h8 \cdot 3 \cdot Ye' A8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YmA8)$	
	7	$h8 \cdot 3 \cdot Ye' A8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot YmA8) + YmA8$	
	A2	2	$h2 \cdot YeA2 + (1-h2) \cdot (2 \cdot Ym'A2)$
		2	$h4 \cdot YeA4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot Ym'A4)$
	A4	3	$h4 \cdot YeA4 + (1-h4) \cdot (2 \cdot Ym'A4) + Ym'A4$
		4	$h4 \cdot 2 \cdot YeA4 + (1-h4) \cdot (4 \cdot Ym'A4)$
YdAn(j)	A8	2	$h8 \cdot YeA8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot Ym'A8)$
		3	$h8 \cdot YeA8 + (1-h8) \cdot (2 \cdot Ym'A8) + Ym'A8$
	4	$h8 \cdot 2 \cdot YeA8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot Ym'A8)$	
	5	$h8 \cdot 2 \cdot YeA8 + (1-h8) \cdot (4 \cdot Ym'A8) + Ym'A8$	
	6	$h8 \cdot 3 \cdot YeA8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot Ym'A8)$	
	7	$h8 \cdot 3 \cdot YeA8 + (1-h8) \cdot (6 \cdot Ym'A8) + Ym'A8$	
8	$h8 \cdot 4 \cdot YeA8 + (1-h8) \cdot (8 \cdot Ym'A8)$		

Contribuciones en fluorescencia para distintas especies oligoméricas con distintas cantidades de unidades marcadas  $j$ , para un modelo de asociación secuencial progresiva (M1). Para una mejor comprensión, se plantean en cada especie sus contribuciones para espectros sin deconvolucionar y considerando que en las ventanas I y III hay contribución de excímeros. En rojo se resaltan aquellas contribuciones que son despreciables, en este caso las contribuciones del excímero en las ventanas I, III y IV (monómero).

donde se expresaron las fluorescencias específicas,  $YpIAN$ ,  $YpIIIAn$ ,  $YpI'An$ ,  $YpIII'An$ ,  $YmAn$  y  $Ym'An$ , por unidad de pireno, mientras que las fluorescencias  $YepI'An$ ,  $YepIII'An$ ,  $YeAn$  y  $Ye'An$  se expresaron por unidad de excímero (dos pireno). Cabe recalcar que, con fin de reducir el número de parámetros, definimos las eficiencias de formación de excímero ( $hn$ ) como función de  $n$  y no de  $j$ .

Es decir, el valor que toma **hn** es un promedio de los valores **hnj** para las distintas sub-especies con distintas unidades marcadas.

7) Si consideramos que la contribución del excímero, por la forma de su espectro y a partir de resultados de deconvolución espectral, es despreciable en las ventanas pI, pIII y pIV, los términos resaltados en rojo en la **Tabla 4.2** pueden ser omitidos, y las expresiones para las fluorescencias en las 4 ventanas espectrales de interés quedarían expresadas de la siguiente manera:

$$F_{pI} = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIA_n} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIII'An} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \quad (43)$$

$$\left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (j \cdot (1-hn) \cdot (Y_{pIA_n} + Y_{pIII'An})) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right) + \left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j-1) \cdot (1-hn) \cdot (Y_{pIA_n} + Y_{pIII'An}) + Y_{pIA4} + Y_{pIII'A4}) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right)$$

---


$$F_{pIII} = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIIIAn} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pI'An} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \quad (44)$$

$$\left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (j \cdot (1-hn) \cdot (Y_{pIIIAn} + Y_{pI'An})) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right) + \left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j-1) \cdot (1-hn) \cdot (Y_{pIIIAn} + Y_{pI'An}) + Y_{pIII'A4} + Y_{pI'A4}) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right)$$

---


$$F_m = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{mAn} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (j \cdot (1-hn) \cdot Y_{mAn}) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right) + \quad (45)$$

$$\left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j-1) \cdot (1-hn) \cdot Y_{mAn} + Y_{mAn}) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right)$$

---


$$F_e = \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{m'An} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j/2) \cdot hn \cdot Y_{eAn+j} + (1-hn) \cdot Y_{m'An}) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right) + \quad (46)$$

$$\left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (((j-1)/2) \cdot hn \cdot Y_{eAn+(j-1)} + (1-hn) \cdot Y_{m'An} + Y_{m'An}) \cdot (f_{An_M(j)} \cdot [An]) \right)$$

donde la contribución en fluorescencia de aquellas sub-especies con dos unidades marcadas se expresan con dos sumatorias, la primera para **j** par y la segunda para **j** impar.

8) Ya que se decidimos trabajar con espectros de fluorescencia normalizados por su fluorescencia total, dividimos las **Ecuaciones 43, 44, 45 y 46** por su fluorescencia total, en nuestro caso calculada como integral entre 350 y 650 nm. Esta fluorescencia indica proporcionalidad con la concentración total de proteína, por lo que puede expresarse de la siguiente manera:

$$F_t = Y_i \cdot [A_t] \quad (47)$$

donde  $Y_i$  es un parámetro propio de cada mutante de apoA-I que depende del grado de marcación y que se estima a partir de los espectros corregidos en función de la concentración total de proteína. Así, las ecuaciones para la fluorescencia normalizada quedan de la siguiente forma (**Ecuaciones 48, 49, 50 y 51**):



$$\text{FNpI} = \left( \begin{array}{l} \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIA_n} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIII'An} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (j \cdot (1-h_n) \cdot (Y_{pIA_n} + Y_{pIII'An})) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j-1) \cdot (1-h_n) \cdot (Y_{pIA_n} + Y_{pIII'An}) + Y_{pIA4} + Y_{pIII'A4}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \end{array} \right) / Y_i \cdot [At] \quad (48)$$

$$\text{FNpIII} = \left( \begin{array}{l} \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pIIIAn} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{pI'An} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (j \cdot (1-h_n) \cdot (Y_{pIIIAn} + Y_{pI'An})) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j-1) \cdot (1-h_n) \cdot (Y_{pIIIAn} + Y_{pI'An}) + Y_{pIII'A4} + Y_{pI'A4}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \end{array} \right) / Y_i \cdot [At] \quad (49)$$

$$\text{FNm} = \left( \begin{array}{l} \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_m \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (j \cdot (1-h_n) \cdot Y_{mAn}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j-1) \cdot (1-h_n) \cdot Y_{mAn} + Y_{mAn}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \end{array} \right) / Y_i \cdot [At] \quad (50)$$

$$\text{FNe} = \left( \begin{array}{l} \left( \sum_{n=1}^{n=8} Y_{m'An} \cdot f_{An_M(j=1)} \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{par})=2}^{j(\text{par})=n} \sum_{n=2}^{n=8} ((j/2) \cdot h_n \cdot Y_{eAn} + j \cdot (1-h_n) \cdot Y_{m'An}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) + \\ \left( \sum_{j(\text{impar})=3}^{j(\text{impar})=n} \sum_{n=2}^{n=8} (((j-1)/2) \cdot h_n \cdot Y_{eAn} + (j-1) \cdot (1-h_n) \cdot Y_{m'An} + Y_{m'An}) \cdot (f_{An_M(j)}) \cdot [An] \right) \end{array} \right) / Y_i \cdot [At] \quad (51)$$

Finalmente, para relacionar nuestras fluorescencias con la concentración total de proteína [At], se resuelve el sistema de ecuaciones planteado en las **Ecuaciones 26, 27, 28 y 29**, y se combinan las soluciones obtenidas, para de esta manera obtener el siguiente set de ecuaciones, que por su complejidad son expresadas en forma simplificada y en una única ecuación (**Ecuación 52**). En esta, se agrega una constante **C** al modelo en pE para corregir aquellas discrepancias en las simplificaciones hechas y lograr ajustar los datos experimentales a concentraciones mínimas de proteína. Cabe recalcar que **Yi** es un parámetro conocido que depende de **g** y que se estima en cada *batch* de proteína marcada (valor de pendiente entre la fluorescencia total vs [At], **Figura 4.1**)

$$F_p([At]) = \left\{ \begin{array}{l} \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_A1, K_A2, K_A3, Y_i, Y_{pIAn}, Y_{pIII'An}, h_n) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_A1, K_A2, K_A3, Y_i, Y_{pIIIAn}, Y_{pI'An}, h_n) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_A1, K_A2, K_A3, Y_i, Y_{mAn}, Y_{pIII'An}, h_n) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_A1, K_A2, K_A3, Y_i, Y_{m'An}, Y_{eAn}, h_n, C) \end{array} \right\} \quad (52)$$

Además, si se procura utilizar espectros deconvolucionados, que es nuestro caso, los siguientes parámetros se eliminan: **YpIII'An**, **YpI'An** e **Ym'An**, obteniéndose la **Ecuación 53**.

**Modelo de asociación secuencial progresiva (M1)**

$$F_p([At]) = \left\{ \begin{array}{l} \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{pIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{pIIIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{mAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{eAn}, hn, C) \end{array} \right\} \quad (53)$$

#### 4.3.4 Equilibrios múltiples para cambios en la relación E/M y P-value, modelos M2, M3 y M4

En el apartado anterior se logró obtener una expresión matemática para un modelo de asociación múltiple de cuatro especies (A, A2, A4 y A8), y tres constantes de asociación ( $K_{A1}$ ,  $K_{A2}$  y  $K_{A3}$ ). Este no es el único modelo que ha sido utilizado para describir los eventos de asociación de apoA-I en solución. La **Tabla 4.3** muestra tres modelos adicionales más el propuesto en este laboratorio. Estos modelos se diferencian entre sí por el número de especies participantes, por la cantidad de constantes de asociación ( $K_A$ ) que presentan y por la conectividad entre los equilibrios. El desarrollo de estos modelos sigue los mismos lineamientos generales del modelo planteado en la sección anterior y son presentadas en las **Ecuaciones 54, 55 y 56**.

**Tabla 4.3: Modelos de equilibrios múltiples**

Modelo	Equilibrios	An	hn	Constantes de asociación $K_A$
Asociación secuencial progresiva (M1)	$2A \rightleftharpoons A_2$	A, A2, A4 y A8	h2, h4 y h8	$K_{A1} = [A_2]/[A]^2$
	$2A_2 \rightleftharpoons A_4$			$K_{A2} = [A_4]/[A_2]^2$
	$2A_4 \rightleftharpoons A_8$			$K_{A3} = [A_8]/[A_4]^2$
Asociación discreta (M2)	$2A \rightleftharpoons A_2$	A, A2, A4 y A8	h2, h4 y h8	$K_{A1} = [A_2]/[A]^2$
	$4A \rightleftharpoons A_4$			$K_{A2} = [A_4]/[A]^4$
	$8A \rightleftharpoons A_8$			$K_{A3} = [A_8]/[A]^8$
Asociación indefinida por adición de monómeros (M3) <sup>a</sup>	$2A \rightleftharpoons A_2$	A, A2, A3, A4, A5, A6, A7 y A8	h2, h3, h4, h5, h6, h7 y h8	$K_{A1} = [A_2]/[A]^2$
	$A_2 + A \rightleftharpoons A_3$			$K_{A1} = [A_3]/([A_2] \cdot [A])$
	$A_3 + A \rightleftharpoons A_4$			$K_{A1} = [A_4]/([A_3] \cdot [A])$
	$A_4 + A \rightleftharpoons A_5$			$K_{A1} = [A_5]/([A_4] \cdot [A])$
	$A_5 + A \rightleftharpoons A_6$			$K_{A1} = [A_6]/([A_5] \cdot [A])$
	$A_6 + A \rightleftharpoons A_7$			$K_{A1} = [A_7]/([A_6] \cdot [A])$
Asociación indefinida por adición de dímeros (M4)	$2A \rightleftharpoons A_2$	A, A2, A4, A6 y A8	h2, h4, h6 y h8	$K_{A1} = [A_2]/[A]^2$
	$2A_2 \rightleftharpoons A_4$			$K_{A2} = [A_4]/[A_2]^2$
	$A_4 + A_2 \rightleftharpoons A_6$			$K_{A2} = [A_6]/([A_4] \cdot [A_2])$
	$A_6 + A_2 \rightleftharpoons A_8$			$K_{A2} = [A_8]/([A_6] \cdot [A_2])$

Se representan los elementos más importantes a tener en cuenta durante el desarrollo de modelos de asociación múltiple. **An** representa la especie oligomérica con **n** sub-unidades. Para especies con **n > 2** se consideran sus eficiencias de formación de excímero **hn**. A pesar de que para un modelo M3 existe una única constante de asociación, la denominamos como  $K_{A1}$ . (<sup>a</sup>) El modelo M3 utilizado es una variante del propuesto por Zehender *et al.* 2012 [54], donde la  $K_{A1}$  del primer equilibrio fue definida como  $K_{A1} = \alpha \cdot [A_2]/[A]^2$  ( $\alpha$  definido como un factor de nucleación).

**Modelo de asociación discreta (M2)**

$$F_p([At]) = \left\{ \begin{array}{l} \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{pIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{pIIIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{mAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, K_{A3}, Y_i, Y_{eAn}, hn, C) \end{array} \right\} \quad (54)$$

**Modelo de asociación indefinida por adición de monómeros (M3)**

$$F_p([At]) = \left\{ \begin{array}{l} \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8\}} f([At], K_{A1}, Y_i, Y_{pIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8\}} f([At], K_{A1}, Y_i, Y_{pIIIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8\}} f([At], K_{A1}, Y_i, Y_{mAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8\}} f([At], K_{A1}, Y_i, Y_{eAn}, hn, C) \end{array} \right\} \quad (55)$$

**Modelo de asociación indefinida por adición de dímeros (M4)**

$$F_p([At]) = \left\{ \begin{array}{l} \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 6, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, Y_i, Y_{pIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 6, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, Y_i, Y_{pIIIAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 6, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, Y_i, Y_{mAn}, hn) \\ \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{n=1}^{n=\{1, 2, 4, 6, 8\}} f([At], K_{A1}, K_{A2}, Y_i, Y_{eAn}, hn, C) \end{array} \right\} \quad (56)$$

## 4.4 Análisis de datos

### 4.4.1 Análisis estadísticos

Los resultados a lo largo de esta Tesis fueron presentados como promedio  $\pm$  error estándar ( $SD/\sqrt{n-1}$ ), donde **SD** es la desviación estándar y **n** el número de repeticiones. Se utilizó un análisis por ANOVA-test para evaluar la significancia entre múltiples medias previa a la comparación de a pares. Se empleó el *Student's t-test* para analizar diferencias significativas entre dos medias (pares) de distintos modelos, por ejemplo, valores de  $K_A$  entre E/M y P-value o entre espectros corregidos y deconvolucionados (**Secciones 2.5.2 y 2.5.3**). Para comparaciones múltiples (mayor a dos y menor a cuatro) se utilizó el *Student's t-test* con corrección por *Bonferroni's pos-doc test*. En esta, la significancia utilizada se calcula como  $\alpha_{\text{Bonferroni}} = \alpha/n$ , donde **n** es el número de comparaciones, de esta manera, disminuyendo la probabilidad de cometer falsos positivos durante cada comparación. Finalmente, para comparar todos los datos (siete comparaciones, **Tabla 2.7**) se utilizó *Tukey-Kramer post-hoc test*.

### 4.4.2 Criterios de selección de modelos

En este apartado se detallan los criterios de selección utilizados para seleccionar el mejor modelo (o los mejores) que describe mejor nuestros datos experimentales cuando se realizan comparaciones entre modelos de distinta complejidad (**Sección 2.6**). Estos criterios se calculan con el software *Wolfram Mathematica* 11.3, para más información ver el siguiente link.

(<https://reference.wolfram.com/language/tutorial/StatisticalModelAnalysis.html>).

#### 4.4.2.1 Criterios predictivos

Estos criterios evalúan la bondad de un ajuste. A continuación, se muestran tres de ellos.

**SSE,  $R^2$  y  $R^2$  Ajustado:**

$$SSE = \sum_{i=1}^{i=N} (x_i - \hat{x}_i)^2 \quad (57)$$

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} \quad SSR = \sum_{i=1}^{i=N} (\hat{x}_i - \bar{x})^2 \quad SST = \sum_{i=1}^{i=N} (x_i - \bar{x})^2 \quad (58)$$

$$R^2 \text{ Ajustado} = 1 - \left( \frac{N}{N-p} \right) \cdot (1 - R^2) \quad (59)$$

donde  $x_i$ , es el valor observado,  $\hat{x}_i$ , el valor estimado por el modelo; y  $\bar{x}$ , el error total. Al mismo tiempo, **SSR** indica la suma de cuadrados del modelo; **SSE**, la suma de cuadrados de los errores (o residuos); y **SST**, la suma de cuadrados totales. En todos los casos, las estimaciones se realizan para un conjunto **N** de datos experimentales, donde **p** indica el número de parámetros del modelo utilizado.

#### ***Pearson Chi-Squared test:***

Para evaluar la dispersión de los residuos luego de un ajuste se hace uso del *Pearson Chi-Squared test* [173]. Básicamente, este test consiste en determinar estadísticamente si la distribución de residuos obtenida luego de un ajuste sigue una distribución determinada, en nuestro caso una distribución normal, asociando, si fuera el caso, esta dispersión únicamente a un error en la adquisición de datos. El test se desarrolla de la siguiente manera:

Deseamos testear si es razonable pensar que nuestra dispersión de residuos  $F$ , fue generada por una variable con distribución  $F_0$ , con distribución normal estándar distribuida alrededor del cero:

Se plantean dos hipótesis:

$H_0 = F \in F_0$             Hipótesis nula

$H_a = F \notin F_0$             Hipótesis alternativa

Esencialmente, el test consiste en aceptar o rechazar la hipótesis nula, midiendo las discrepancias entre los datos observados y lo que se espera de ellos bajo  $H_0$ . Esta diferencia es reflejada en un estadístico  $T_n$ , además de tener en cuenta el número de medidas experimentales (grados de libertad  $N-1$ ) y la significancia  $\alpha$ . En nuestro caso se plantean dos escenarios:

Si  $T_n \geq X^2_{N-1,\alpha}$ , rechazar  $H_0$ . ( $X^2_{N-1,\alpha}$ , valor crítico de tabla)

Si  $T_n < X^2_{N-1,\alpha}$ , no rechazar  $H_0$ . ( $X^2_{N-1,\alpha}$ , valor crítico de tabla)

Si no se rechaza  $H_a$  (se acepta  $H_0$ ), los elementos de la muestra fueron generados por una distribución normal estándar, y en consecuencia los errores surgen de la adquisición de medidas. En el caso contrario, no fueron generados por dicha distribución, el modelo no ajusta correctamente nuestros datos. Cabe recalcar que este método se utilizó en forma complementaria, primero realizando una inspección visual de los residuos y luego evaluando con el test, donde en la mayoría de los casos la inspección visual fue suficiente para evaluar la dispersión de los residuos.

#### 4.4.2.2 Criterios basados en la información estadística

Los indicadores con criterio de información estadística abordan el compromiso entre la complejidad y la capacidad predictiva de un modelo. Cuanto más complejo sea un modelo peor será su capacidad para predecir en un abanico amplio de situaciones. En caso contrario, un modelo con pocos parámetros no podría predecir en su totalidad la complejidad de un sistema. De esta manera,



un modelo con los componentes de mayor importancia es el ideal para predecir el comportamiento de un sistema sin perder información.

Para encontrar el mejor modelo  $k$  entre un conjunto de modelos, necesitamos un indicador capaz de medir su capacidad explicativa que penalice por su complejidad. Esto es lo que hacen los indicadores con criterio de información que se resumen con la **Ecuación 60**:

$$xIC_k = \text{bondad de un ajuste}_k - \text{complejidad}_k \quad (60)$$

donde  $xIC$  indica el criterio de información para un modelo  $k$  entre un conjunto de modelos.

#### 4.4.2.2.1 Criterio de información de Akaike (AIC)

El AIC fue introducido por *Akaike et al.* 1971 [174]. Este es un criterio simple y objetivo para la selección de modelos, definido para el  $k$ -ésimo modelo de la siguiente forma (**Ecuación 61**):

$$AIC_k = -2 \cdot \text{Ln}(\hat{L}) + 2 \cdot p \quad (61)$$

donde  $\hat{L}$  es el valor máximo de la función de verosimilitud aplicada en todos los parámetros de un modelo  $k$ , que actúa como criterio de bondad del ajuste. Por otro lado,  $p$  indica el número de parámetros libres que penaliza por la complejidad del modelo. De esta manera, el mejor modelo, entre un conjunto de modelos, es el que minimiza el AIC. Esta estimación es relativa y depende del número de observaciones. Por lo tanto, un valor individual de AIC no es interpretable por sí solo, y los valores AIC sólo tienen sentido cuando se realizan comparaciones entre modelos para un mismo set de datos experimentales.

A modo de poder comparar y clasificar que tan verosímil es un modelo determinado con respecto a un conjunto de modelos, haciendo uso del mismo conjunto de datos experimentales, se

utiliza el  $\Delta AIC$ , propuesto por *Burnham y Anderson et al.* 2001 [141], definido de la siguiente forma para el  $k$ -ésimo modelo dentro de un conjunto de modelos (**Ecuación 62**):

$$\Delta AIC_k = AIC_k - AIC_{\min} \quad (62)$$

Como se desconoce qué magnitud de  $\Delta AIC$  constituye una diferencia considerable y significativa, *Burnham y Anderson* propusieron también la siguiente regla, en valores de  $\Delta AIC$ : 1)  $< 2$ , relación sustancial, 2) 4-7, relación considerablemente menor, y 3)  $> 10$ , esencialmente ninguna relación

#### 4.4.2.2 Criterio de información de Akaike corregido (AICc)

Cuando el tamaño de la muestra es finito o la diferencia entre el número de datos experimentales y de parámetros es proxima, *Sugiura et al.* 1978 [175] propusieron la siguiente corrección al AIC como el criterio de información de Akaike corregido (AICc), definido para el  $k$ -ésimo modelo de la siguiente forma (**Ecuación 63**):

$$AICc_k = AIC_k + \frac{2 \cdot p^2 + 2 \cdot p}{N - p - 1} \quad (63)$$

donde  $p$  y  $N$  indican el número de parámetros en el modelo y de datos experimentales, respectivamente. Es recomendable que para cada modelo se cumpla que  $N > p + 2$ , el número de elementos del experimento debe ser siempre mayor que el número de parámetros del modelo que describe los datos. Es así que cuando el cociente  $N/p$  es suficientemente grande, ambos valores (AIC y AICc) son muy similares.

#### 4.4.2.2.3 Criterio de información Bayesiano (BIC)

El BIC, propuesto por *Schwarz et al.* 1978 [176], al igual que el propuesto por Akaike es un criterio que pondera la verosimilitud de un modelo con el número de parámetro que compone este, agregando además un componente de penalización con respecto al tamaño de la muestra (**N**), en forma de **Ln(N)**. La estructura del modelo es la siguiente (**Ecuación 64**):

$$\mathbf{BIC}_k = -2 \cdot \mathbf{Ln}(\hat{\mathbf{L}}) + \mathbf{p} \cdot \mathbf{Ln}(\mathbf{N}) \quad (64)$$

donde **p** es el número de parámetros en el modelo,  $\hat{\mathbf{L}}$  es el valor máximo de la función de verosimilitud aplicada en todos los parámetros del modelo y **N** el tamaño de la muestra. De la misma forma que con AIC, valores bajos de BIC son indicativos de buenos modelos entre un conjunto de modelos.

Esta página se encuentra en blanco

# **BIBLIOGRAFÍA**

Esta página se encuentra en blanco

- [1] G.A. Roth, A. Et, Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017, *Lancet*. 392 (2018) 1736–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7).
- [2] J.G. and J. Johnson, *Atherosclerosis Molecular and Cellular Mechanisms*, 2010.
- [3] S.K. Cheema, *Biochemistry of atherosclerosis*, Springer, New York, 2006. <https://doi.org/10.1007/0-387-36279-3>.
- [4] K. Skålen, M. Gustafsson, E. Knutsen Rydberg, L.M. Hultén, O. Wiklund, T.L. Innerarity, J. Boren, Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis, *Nature*. 417 (2002) 750–754. <https://doi.org/10.1038/nature00804>.
- [5] W.B. Kannel, Status of risk factors and their consideration in antihypertensive therapy, *Am. J. Cardiol*. 59 (1987) 80–90. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(87\)90182-2](https://doi.org/10.1016/0002-9149(87)90182-2).
- [6] N. Abumrad, C. Coburn, A. Ibrahim, Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1441 (1999) 4–13. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00137-7](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00137-7).
- [7] N. Leitinger, Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol*. 14 (2003) 421–430. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000092616.86399.dc>.
- [8] E.E. Eriksson, X. Xie, J. Werr, P. Thoren, L. Lindbom, Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo, *J. Exp. Med*. 194 (2001) 205–217. <https://doi.org/10.1084/jem.194.2.205>.
- [9] C.A. Janeway, R. Medzhitov, Innate Immune Recognition, *Annu. Rev. Immunol*. 20 (2002) 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.
- [10] L. Peiser, S. Mukhopadhyay, S. Gordon, Scavenger receptors in innate immunity, *Curr. Opin. Immunol*. 14 (2002) 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00307-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00307-7).
- [11] L. Nagy, P. Tontonoz, J.G.A. Alvarez, H. Chen, R.M. Evans, Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ , *Cell*. 93 (1998) 229–240. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81574-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81574-3).
- [12] J. Frostegård, A.K. Ulfgren, P. Nyberg, U. Hedin, J. Swedenborg, U. Andersson, G.K. Hansson, Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines, *Atherosclerosis*. 145 (1999) 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00011-8).
- [13] K. Uyemura, A.M. Fogelman, R.L. Modlin, Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis., *J. Clin. Invest*. 97 (1996) 2130–2138. <https://doi.org/10.1172/JCI118650>. Research.
- [14] P. Ganguly, S.F. Alam, Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease, *Nutr. J*. 14 (2015) 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>.
- [15] T. Komoda, *The HDL Handbook*, 1st Editio, Academic Press, 2010. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-62966-4>.
- [16] E. Herrera, C. Barbas, Vitamin E: action, metabolism and perspectives, *J. Physiol. Biochem*. 57 (2001) 43–56. <https://doi.org/10.1007/bf03179812>.
- [17] P. Mardones, P. Strobel, S. Miranda, F. Leighton, V. Quiñones, L. Amigo, J. Rozowski, M. Krieger, A. Rigotti,  $\alpha$ -Tocopherol Metabolism Is Abnormal in Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI)-Deficient Mice, *J. Nutr*. 132 (2002) 443–449. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.443>.
- [18] A.D. Tselepis, M.J. Chapman, Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase, *Atheroscler. Suppl*. 3 (2002) 57–68. [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(02)00045-4).
- [19] M.I. Mackness, P.N. Durrington, B. Mackness, The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 4 (2004) 211–217. <https://doi.org/10.2165/00129784-200404040-00002>.
- [20] P.W. Connelly, D. Draganov, G.F. Maguire, Paraoxonase-1 does not reduce or modify oxidation of phospholipids by peroxynitrite, *Free Radic. Biol. Med*. 38 (2005) 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.010>.
- [21] C. Mineo, P.W. Shaul, HDL Stimulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase, *Trends Cardiovasc. Med*. 13 (2003) 226–231. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(03\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(03)00098-7).

- [22] C. Mineo, I.S. Yuhanna, M.J. Quon, P.W. Shaul, High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9142–9149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211394200>.
- [23] X.A. Li, L. Guo, J.L. Dressman, R. Asmis, E.J. Smart, A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19087–19096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500944200>.
- [24] M. Ahotupa, Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis, *Free Radic. Res.* 51 (2017) 439–447. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1319944>.
- [25] J.F. Oram, Tangier disease and ABCA1, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1529 (2000) 321–330. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00157-8](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00157-8).
- [26] N. Wang, D.L. Silver, P. Costet, A.R. Tall, Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33053–33058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005438200>.
- [27] B. Haidar, M. Denis, M. Marcil, L. Krimbou, J. Genest, Apolipoprotein A-I Activates Cellular cAMP Signaling through the ABCA1 Transporter, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 9963–9969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313487200>.
- [28] G.V. and G.A. N. Theret, C. Delbart, G. Aguié, J.C. Fruchart, Cholesterol efflux from adipose cells is coupled to diacylglycerol production and protein kinase C activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 1361–1368. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)80938-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80938-6).
- [29] A.J. Mendez, J.F. Oram, E.L. Bierman, Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10104–10111.
- [30] C. Tang, A.M. Vaughan, J.F. Oram, Janus Kinase 2 Modulates the Apolipoprotein Interactions with ABCA1 Required for Removing Cellular Cholesterol, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 7622–7628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312571200>.
- [31] J.F. Oram, A.M. Vaughan, ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HBL apolipoproteins, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 253–260. <https://doi.org/10.1097/00041433-200006000-00005>.
- [32] D. Castaño, C. Rattanasopa, V.F. Monteiro-Cardoso, M. Corliano, Y. Liu, S. Zhong, M. Rusu, E.A. Liehn, R.R. Singaraja, Lipid efflux mechanisms, relation to disease and potential therapeutic aspects, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 159 (2020) 54–93. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.013>.
- [33] A. Jonas, Lecithin cholesterol acyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1529 (2000) 245–256. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00153-0).
- [34] A.J. Murphy, High Density Lipoprotein: Assembly, Structure, Cargo, and Functions, *ISRN Physiol.* 2013 (2013) 1–20. <https://doi.org/10.1155/2013/186365>.
- [35] H. Shinkai, Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases, *Vasc. Health Risk Manag.* 8 (2012) 323–331. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S25238>.
- [36] J. Armitage, M. V. Holmes, D. Preiss, Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition for Preventing Cardiovascular Events: JACC Review Topic of the Week, *J. Am. Coll. Cardiol.* 73 (2019) 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.10.072>.
- [37] A. Matsunaga, Apolipoprotein A-I Mutations and Clinical Evaluation, in: *HDL Handb. Biol. Funct. Clin. Implic.* Second Ed., Second Ed, Elsevier, 2014: pp. 9–35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407867-3.00002-0>.
- [38] M.N. Oda, T.M. Forte, R.O. Ryan, J.C. Voss, The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger., *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 455–460. <https://doi.org/10.1038/nsb931>.
- [39] J.O. Lagerstedt, M.S. Budamagunta, M.N. Oda, J.C. Voss, Electron paramagnetic resonance spectroscopy of site-directed spin labels reveals the structural heterogeneity in the N-terminal domain of apoA-I in solution., *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9143–9149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608717200>.
- [40] J.T. Melchior, R.G. Walker, A.L. Cooke, J. Morris, M. Castleberry, T.B. Thompson, M.K. Jones, H.D. Song, K.A. Rye, M.N. Oda, M.G. Sorci-Thomas, M.J. Thomas, J.W. Heinecke, X. Mei, D. Atkinson, J.P. Segrest, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, W.S. Davidson, A consensus model of human apolipoprotein A-I in its monomeric and lipid-free state, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (2017) 1093–1099. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3501>.
- [41] R.A.G.D. Silva, G.M. Hilliard, J. Fang, S. Macha, W.S. Davidson, A three-dimensional molecular model of lipid-



- free apolipoprotein A-I determined by cross-linking/mass spectrometry and sequence threading., *Biochemistry*. 44 (2005) 2759–69. <https://doi.org/10.1021/bi047717+>.
- [42] R.D. Pollard, B. Fulp, M.P. Samuel, M.G. Sorci-thomas, M.J. Thomas, The Conformation of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I in Solution, *Biochemistry*. 52 (2013) 9470–9418. <https://doi.org/10.1021/bi401080k>.
- [43] J.P. Segrest, M.K. Jones, B. Shao, J.W. Heinecke, An experimentally robust model of monomeric apolipoprotein A-I created from a chimera of two X-ray structures and molecular dynamics simulations., *Biochemistry*. 53 (2014) 7625–7640. <https://doi.org/10.1021/bi501111j>.
- [44] X. Zhang, D. Lei, L. Zhang, M. Rames, S. Zhang, A model of lipid-free apolipoprotein A-I revealed by iterative molecular dynamics simulation, *PLoS One*. 10 (2015) 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120233>.
- [45] Y. Fang, O. Gursky, D. Atkinson, Structural studies of N- and C-terminally truncated human apolipoprotein A-I., *Biochemistry*. 42 (2003) 6881–6890. <https://doi.org/10.1021/bi034152t>.
- [46] J.M. Donovan, G.B. Benedek, M.C. Carey, Self-association of human apolipoproteins A-I and A-II and interactions of apolipoprotein A-I with bile salts: quasi-elastic light scattering studies., *Biochemistry*. 26 (1987) 8116–8125. <https://doi.org/10.1021/bi00399a015>.
- [47] L.B. Vitello, A.M. Scanu, Studies on human serum high density lipoproteins. Self-association of apolipoprotein A-I in aqueous solutions., *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 1131–1136. <https://doi.org/10.1021/bi00650a031>.
- [48] S. Jayaraman, S. Abe-Dohmae, S. Yokoyama, G. Cavigliolo, Impact of self-association on function of apolipoprotein A-I., *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35610–35623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262485>.
- [49] C.E. Ta-Lee Teng, A.A.M.S. Donal L. Bardeau, An Ultracentrifugal Study of the Self-association Apolipoprotein A-I in Solution of Canine, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8634–8638. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)75268-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75268-5).
- [50] S. Formisano, H.B. Brewer, J.C. Osborne, Effect of pressure and ionic strength on the self-association of Apo-A-I from the human high density lipoprotein complex, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 354–359. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38212-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38212-1).
- [51] D.L. Barbeau, A. Jonas, T. lee Teng, A.M. Scanu, Asymmetry of Apolipoprotein A-I in Solution as Assessed from Ultracentrifugal, Viscometric, and Fluorescence Polarization Studies, *Biochemistry*. 18 (1979) 362–369. <https://doi.org/10.1021/bi00569a021>.
- [52] E.D. Prieto, H.A. Garda, Membrane insertion topology of the central apolipoprotein A-I region. Fluorescence studies using single tryptophan mutants., *Biochemistry*. 50 (2011) 466–479. <https://doi.org/10.1021/bi1009634>.
- [53] H.J. Schönfeld, D. Roessner, J. Seelig, Self-Association of Apo A-1 Studied with Dynamic and Static Light Scattering, *J. Phys. Chem. B*. 120 (2016) 1228–1235. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b12397>.
- [54] F. Zehender, A. Ziegler, H.-J. Schönfeld, J. Seelig, Thermodynamics of protein self-association and unfolding. The case of apolipoprotein A-I., *Biochemistry*. 51 (2012) 1269–1280. <https://doi.org/10.1021/bi2013799>.
- [55] A. Leroy, A. Jonas, Native-like structure and self-association behavior of apolipoprotein A-I in a water/n-propanol solution., *Biochim. Biophys. Acta*. 1212 (1994) 285–294. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90202-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90202-X).
- [56] W.S. Davidson, T. Hazlett, W.W. Mantulin, A. Jonas, The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 13605–13610. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13605>.
- [57] J.V.C. Horn, R.A. Ellena, J.J. Tran, W.H.J. Beck, V. Narayanaswami, P.M.M. Weers, Transfer of C-terminal residues of human apolipoprotein A-I to insect apolipoprotein III creates a two-domain chimeric protein with enhanced lipid binding activity, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1859 (2017) 1317–1325. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.017>.
- [58] L.A. Fuentes, W.H.J. Beck, M. Tsujita, P.M.M. Weers, Charged Residues in the C-Terminal Domain of Apolipoprotein A-I Modulate Oligomerization, *Biochemistry*. 57 (2018) 2200–2210. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01052>.
- [59] X. Mei, D. Atkinson, Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization., *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38570–38582. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260422>.
- [60] P.S. Chetty, L. Mayne, S. Lund-Katz, D. Stranz, S.W. Englander, M.C. Phillips, Helical structure and stability in human apolipoprotein A-I by hydrogen exchange and mass spectrometry., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106

- (2009) 19005–19010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909708106>.
- [61] V. Gogonea, Structural insights into high density lipoprotein: Old models and new facts, *Front. Pharmacol.* 6 (2016). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00318>.
- [62] J.T. Melchior, R.G. Walker, J. Morris, M.K. Jones, J.P. Segrest, D.B. Lima, P.C. Carvalho, F.C. Gozzo, M. Castleberry, T.B. Thompson, W.S. Davidson, An evaluation of the crystal structure of c-terminal truncated apolipoprotein A-I in solution reveals structural dynamics related to lipid binding, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 5439–5451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.706093>.
- [63] H. Saito, P. Dhanasekaran, D. Nguyen, P. Holvoet, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23227–23232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303365200>.
- [64] C. Arnulphi, L. Jin, M.A. Tricerri, A. Jonas, Enthalpy-driven apolipoprotein A-I and lipid bilayer interaction indicating protein penetration upon lipid binding., *Biochemistry.* 43 (2004) 12258–12264. <https://doi.org/10.1021/bi036118k>.
- [65] J.A. Gazzara, M.C. Phillips, S. Lund-Katz, M.N. Palgunachari, J.P. Segrest, G.M. Anantharamaiah, J.W. Snow, Interaction of class A amphipathic helical peptides with phospholipid unilamellar vesicles, *J. Lipid Res.* 38 (1997) 2134–2146. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37143-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37143-1).
- [66] M.F. Henning, H.A. Garda, L. Bakas, Biophysical characterization of interaction between apolipoprotein A-I and bacterial lipopolysaccharide., *Cell Biochem. Biophys.* 44 (2006) 490–496. <https://doi.org/10.1385/CBB:44:3:490>.
- [67] M.A. Tricerri, J.D. Toledo, S.A. Sanchez, T.L. Hazlett, E. Gratton, A. Jonas, H.A. Garda, Visualization and analysis of apolipoprotein A-I interaction with binary phospholipid bilayers., *J. Lipid Res.* 46 (2005) 669–678. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400340-JLR200>.
- [68] H. Saito, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins., *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 350–380. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.05.002>.
- [69] J.P. Segrest, D.W. Garber, C.G. Brouillette, S.C. Harvey, G.M. Anantharamaiah, The amphipathic  $\alpha$  helix: A multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 303–369. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60643-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60643-9).
- [70] X. Mei, D. Atkinson, Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development, *Arch. Med. Res.* 46 (2015) 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.012>.
- [71] J.P. Segrest, R.L. Jackson, J.D. Morrisett, A.M. Gotto, A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins, *FEBS Lett.* 38 (1974) 247–253. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80064-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80064-5).
- [72] A. Jonas, Lipoprotein structure, *New Compr. Biochem.* 36 (2002) 483–504. [https://doi.org/10.1016/s0167-7306\(02\)36020-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7306(02)36020-4).
- [73] A. Jonas, H.T. McHugh, Reaction of lecithin: cholesterol acyltransferase with micellar substrates. Effect of particle sizes., *Biochim. Biophys. Acta.* 794 (1984) 361–372. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(84\)90002-x](https://doi.org/10.1016/0005-2760(84)90002-x).
- [74] W.S. Davidson, W. V. Rodriguez, S. Lund-Katz, W.J. Johnson, G.H. Rothblat, M.C. Phillips, Effects of acceptor particle size on the efflux of cellular free cholesterol, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17106–17113. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17106>.
- [75] J.B.C. Papers, M. Doi, K.N. Liadaki, T. Liu, S. Xu, B.Y. Ishida, P.N. Duchateau, J.P. Krieger, J. Kane, M. Krieger, V.I. Zannis, Binding of High Density Lipoprotein (HDL) and Discoidal Reconstituted HDL to the HDL Receptor Scavenger Receptor Class B Type I, *J. Biological Chem.* 275 (2000) 21262–21271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002310200>.
- [76] A.N.A. Jonas, Reconstitution of high-density lipoproteins, *Methods Enzym.* 128 (1986) 553–582. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)28092-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)28092-1).
- [77] A. Jonas, K.E. Kézdy, J.H. Wald, Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 4818–4824. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83664-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83664-X).
- [78] D.W. Borhani, D.P. Rogers, J.A. Engler, C.G. Brouillette, Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 12291–12296. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12291>.
- [79] J.P. Segrest, M.K. Jones, A.E. Klön, C.J. Sheldahl, M. Hellinger, H. De Loof, S.C. Harvey, A Detailed Molecular

- Belt Model for Apolipoprotein A-I in Discoidal High Density Lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31755–31758. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31755>.
- [80] W.S. Davidson, G.M. Hilliard, The spatial organization of apolipoprotein A-I on the edge of discoidal high density lipoprotein particles: a mass spectrometry study., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27199–27207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302764200>.
- [81] R.A.G.D. Silva, G.M. Hilliard, L. Li, J.P. Segrest, W.S. Davidson, A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins., *Biochemistry.* 44 (2005) 8600–8607. <https://doi.org/10.1021/bi050421z>.
- [82] S. Bibow, Y. Polyhach, C. Eichmann, C.N. Chi, J. Kowal, S. Albiez, R.A. Mcleod, H. Stahlberg, G. Jeschke, P. Güntert, R. Riek, Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I, *Nat. Publ. Gr.* 24 (2016) 187–193. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3345>.
- [83] D.D.O. Martin, M.S. Budamagunta, R.O. Ryan, J.C. Voss, M.N. Oda, Apolipoprotein A-I assumes a “looped belt” conformation on reconstituted high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20418–20426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602077200>.
- [84] S. Bhat, M.G. Sorci-Thomas, R. Tuladhar, M.P. Samuel, M.J. Thomas, Conformational adaptation of apolipoprotein A-I to discretely sized phospholipid complexes, *Biochemistry.* 46 (2007) 7811–7821. <https://doi.org/10.1021/bi700384t>.
- [85] Z. Wu, M.A. Wagner, L. Zheng, J.S. Parks, J.M.S. Iii, J.D. Smith, V. Gogonea, S.L. Hazen, The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2008). <https://doi.org/10.1038/nsmb1284>.
- [86] P.S. Chetty, D. Nguyen, M. Nickel, S. Lund-Katz, L. Mayne, S.W. Englander, M.C. Phillips, Comparison of apoA-I helical structure and stability in discoidal and spherical HDL particles by HX and mass spectrometry, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1589–1597. <https://doi.org/10.1194/jlr.M034785>.
- [87] A.E. Klon, J.P. Segrest, S.C. Harvey, Molecular dynamics simulations on discoidal HDL particles suggest a mechanism for rotation in the apo A-I belt model., *J. Mol. Biol.* 324 (2002) 703–721. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01143-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01143-9).
- [88] A.Y. Shih, I.G. Denisov, J.C. Phillips, S.G. Sligar, K. Schulten, Molecular Dynamics Simulations of Discoidal Bilayers Assembled from Truncated Human Lipoproteins, *Biophys. J.* 88 (2005) 548–556. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046896>.
- [89] A. Debnath, L. V. Schäfer, Structure and Dynamics of Phospholipid Nanodiscs from All-Atom and Coarse-Grained Simulations, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 6991–7002. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02101>.
- [90] M. Pourmousa, R.W. Pastor, Molecular dynamics simulations of lipid nanodiscs, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 2094–2107. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2018.04.015>.
- [91] B. Córscico, J.D. Toledo, H.A. Garda, 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 (2001) 16978–16985. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011533200>.
- [92] K.A. Manthei, D. Patra, C.J. Wilson, M. V Fawaz, L. Piersimoni, J.C. Shenkar, W. Yuan, P.C. Andrews, J.R. Engen, A. Schwendeman, M.D. Ohi, J.J.G. Tesmer, Structural analysis of lecithin:cholesterol acyltransferase bound to high density lipoprotein particles, *Commun. Biol.* 3 (2020) 28. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0749-z>.
- [93] Z. Wu, V. Gogonea, X. Lee, M.A. Wagner, X. Li, Y. Huang, A. Undurti, R.P. May, M. Haertlein, M. Moulin, I. Gutsche, G. Zaccai, J.A. Didonato, S.L. Hazen, J.F.M.B. Laboratory-cnrs, R. Jules, Double Superhelix Model of High Density Lipoprotein, *J. Biological Chem.* 284 (2009) 36605–36619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.039537>.
- [94] M.K. Jones, L. Zhang, A. Catta, L. Li, M.N. Oda, G. Ren, J.P. Segrest, Assessment of the validity of the double superhelix model for reconstituted high density lipoproteins: a combined computational-experimental approach., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 41161–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187799>.
- [95] V. Gogonea, Z. Wu, X. Lee, V. Pipich, X.-M. Li, A.I. Ioffe, J.A. Didonato, S.L. Hazen, Congruency between biophysical data from multiple platforms and molecular dynamics simulation of the double-super helix model of nascent high-density lipoprotein., *Biochemistry.* 49 (2010) 7323–43. <https://doi.org/10.1021/bi100588a>.
- [96] M. Miyazaki, M. Nakano, M. Fukuda, T. Handa, Smaller discoidal high-density lipoprotein particles form saddle

- surfaces, but not planar bilayers., *Biochemistry*. 48 (2009) 7756–63. <https://doi.org/10.1021/bi900785x>.
- [97] F. Gu, M.K. Jones, J. Chen, J.C. Patterson, A. Catte, W.G. Jerome, L. Li, J.P. Segrest, Structures of discoidal high density lipoproteins: a combined computational-experimental approach., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 4652–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069914>.
- [98] M. Miyazaki, Y. Tajima, T. Handa, M. Nakano, Static and dynamic characterization of nanodiscs with apolipoprotein A-I and its model peptide., *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 12376–82. <https://doi.org/10.1021/jp102074b>.
- [99] R.A.G.D. Silva, R. Huang, J. Morris, J. Fang, E.O. Gracheva, G. Ren, A. Kontush, W.G. Jerome, K.-A. Rye, W.S. Davidson, Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 12176–12181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803626105>.
- [100] Z. Wu, V. Gogonea, X. Lee, R.P. May, V. Pipich, M.A. Wagner, A. Undurti, T.C. Tallant, C. Baleanu-Gogonea, F. Charlton, A. Ioffe, J.A. DiDonato, K.A. Rye, S.L. Hazen, The low resolution structure of ApoA1 in spherical high density lipoprotein revealed by small angle neutron scattering, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12495–12508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209130>.
- [101] O. Gursky, Crystal structure of  $\Delta(185-243)$ ApoA-I suggests a mechanistic framework for the protein adaptation to the changing lipid load in good cholesterol: from flatland to sphereland via double belt, belt buckle, double hairpin and trefoil/tetrafoil., *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.027>.
- [102] J. Aguiar, P. Carpena, J.A. Molina-Bolivar, C. Carnero Ruiz, On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method, *J. Colloid Interface Sci.* 258 (2003) 116–122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00082-6).
- [103] A.I. Mitsionis, T.C. Vaimakis, Estimation of AOT and SDS CMC in a methanol using conductometry, viscometry and pyrene fluorescence spectroscopy methods, *Chem. Phys. Lett.* 547 (2012) 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2012.07.059>.
- [104] L. Piñeiro, M. Novo, W. Al-Soufi, Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 215 (2015) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.010>.
- [105] A. Maity, P. Mukherjee, T. Das, P. Ghosh, P. Purkayastha, Förster resonance energy transfer between pyrene and bovine serum albumin: Effect of the hydrophobic pockets of cyclodextrins, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 92 (2012) 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.02.088>.
- [106] J. Saha, D. Dey, A.D. Roy, D. Bhattacharjee, S. Arshad, Multi step FRET among three laser dyes Pyrene, Acridine and Rhodamine B, *J. Lumin.* 172 (2016) 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.12.004>.
- [107] C. Monahan, J.T. Bien, B.D. Smith, Fluorescence sensing due to allosteric switching of pyrene functionalized functionalized cis-cyclohexane-1,3-dicarboxylate, *Chem. Commun.* (1998) 431–432. <https://doi.org/10.1039/A705445I>.
- [108] P.L. Chong, T.E. Thompson, Oxygen quenching of pyrene-lipid fluorescence in phosphatidylcholine vesicles. A probe for membrane organization, *Biophys. J.* 47 (1985) 613–621. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83957-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83957-6).
- [109] X.U. Wenyong, Oxygen Sensors Based on Luminescence Quenching: Interactions of Pyrene with the Polymer Supports, *Anal. Chim.* 67 (1995) 3172–3180. <https://doi.org/10.1021/ac00114a012>.
- [110] S.A. Ruetten, J.K. Thomas, Reactions of pyrene excited states with oxygen on the surface of porous silica gel and similar surfaces, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 1278–1286. <https://doi.org/10.1021/jp983313d>.
- [111] M. Okamoto, O. Wada, Fluorescence quenching of benzo(a)pyrene by oxygen and carbon tetrabromide in n-hexane under high pressure: estimation of the diffusion coefficient of quencher, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 138 (2001) 87–93. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(00\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(00)00401-9).
- [112] B.J. Basu, K.S. Rajam, Comparison of the oxygen sensor performance of some pyrene derivatives in silicone polymer matrix, *Sensors Actuators, B Chem.* 99 (2004) 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2003.12.047>.
- [113] Y.X. Yuan, H.S. Peng, J.T. Ping, X.H. Wang, F.T. You, A Pyrene@Micelle Sensor for Fluorescent Oxygen Sensing, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/245031>.
- [114] E. Faggi, J. Serra-Vinardell, M.D. Pandey, J. Casas, G. Fabriàs, S. V Luis, I. Alfonso, Pseudopeptidic fluorescent on-off pH sensor based on pyrene excimer emission: Imaging of acidic cellular organelles, *Sensors Actuators, B Chem.* 234 (2016) 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.037>.

- [115] L. Machi, I.C. Muñoz, R. Pérez-González, M. Sánchez, M. Inoue, Pyrene bichromophores composed of polyaminopolycarboxylate interlink: pH response of excimer emission, *Supramol. Chem.* 21 (2009) 665–673. <https://doi.org/10.1080/10610270802709360>.
- [116] K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas, Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 2039–2044. <https://doi.org/10.1021/ja00449a004>.
- [117] B. Zelent, J.M. Vanderkooi, R.G. Coleman, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, Protonation of excited state pyrene-1-carboxylate by phosphate and organic acids in aqueous solution studied by fluorescence spectroscopy, *Biophys. J.* 91 (2006) 3864–3871. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.088740>.
- [118] E. Villemin, B. Elias, M. Devillers, J. Marchand-Brynaert, A pyrene- and phosphonate-containing fluorescent probe as guest molecule in a host polymer matrix, *Molecules.* 18 (2013) 1897–1915. <https://doi.org/10.3390/molecules18021897>.
- [119] N. V Nucci, B. Zelent, J.M. Vanderkooi, Pyrene-1-carboxylate in water and glycerol solutions: Origin of the change of pK upon excitation, *J. Fluoresc.* 18 (2008) 41–49. <https://doi.org/10.1007/s10895-007-0233-x>.
- [120] G. Bains, A.B. Patel, V. Narayanaswami, Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes., *Molecules.* 16 (2011) 7909–7935. <https://doi.org/10.3390/molecules16097909>.
- [121] A. Nakajima, Solvent Effect on the Vibrational Structures of the Fluorescence and Absorption Spectra of Pyrene., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 44 (1971) 3272–3277. <https://doi.org/10.1246/bcsj.44.3272>.
- [122] A. Nakajima, Fluorescence Lifetime of Pyrene in Different Solvents, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 46 (1973) 2602–2604. <https://doi.org/10.1246/bcsj.46.2602>.
- [123] D.C. Dong, M.A. Winnik, The py scale of solvent polarities. solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with  $\epsilon$  and  $\gamma$  values, *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 17–21. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1982.tb03805.x>.
- [124] D.S. Karpovich, G.J. Blanchard, Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the py polarity scale, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 3951–3958. <https://doi.org/10.1021/j100012a014>.
- [125] S.S. Lehrer, Intramolecular pyrene excimer fluorescence: A probe of proximity and protein conformational change, *Methods Enzymol.* 278 (1997) 286–295. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)78015-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)78015-7).
- [126] A.D. Verin, N.B. Gusev, Ca<sup>2+</sup>-induced conformational changes in cardiac troponin C as measured by N-(1-pyrene)maleimide fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 956 (1988) 197–208. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90266-X](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90266-X).
- [127] Y.M. Liou, F. Fuchs, Pyrene-labeled cardiac troponin C. Effect of Ca<sup>2+</sup> on monomer and excimer fluorescence in solution and in myofibrils, *Biophys. J.* 61 (1992) 892–901. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81896-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81896-9).
- [128] L.Á. Cuellar, ADAPTABILIDAD CONFORMACIONAL DE APOLIPOPROTEÍNA A-I EN COMPLEJOS LIPOPROTEÍCOS DISCOIDALES, 2012. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [129] L.Á. Cuellar, E.D. Prieto, L.V. Cabaleiro, H.A. Garda, Apolipoprotein A-I configuration and cell cholesterol efflux activity of discoidal lipoproteins depend on the reconstitution process., *Biochim. Biophys. Acta.* 1841 (2014) 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.10.017>.
- [130] E.D. Prieto, N. Ramella, L.A. Cuellar, M.A. Tricerri, H.A. Garda, Characterization of a human apolipoprotein a-I construct expressed in a bacterial system., *Protein J.* 31 (2012) 681–688. <https://doi.org/10.1007/s10930-012-9448-z>.
- [131] R.O. Ryan, T.M. Forte, M.N. Oda, Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I., *Protein Expr. Purif.* 27 (2003) 98–103. [https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(02\)00568-5](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(02)00568-5).
- [132] J. Schymkowitz, J. Borg, F. Stricher, R. Nys, F. Rousseau, L. Serrano, The FoldX web server: An online force field, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 382–388. <https://doi.org/10.1093/nar/gki387>.
- [133] R. Guerois, J.E. Nielsen, L. Serrano, Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: A study of more than 1000 mutations, *J. Mol. Biol.* 320 (2002) 369–387. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00442-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00442-4).
- [134] R.A. Studer, P.A. Christin, M.A. Williams, C.A. Orengo, Stability-activity tradeoffs constrain the adaptive evolution of RubisCO, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 2223–2228.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1310811111>.

- [135] T. Kido, H. Kurata, K. Kondo, H. Itakura, M. Okazaki, T. Urata, S. Yokoyama, Bioinformatic Analysis of Plasma Apolipoproteins A-I and A-II Revealed Unique Features of A-I/A-II HDL Particles in Human Plasma, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep31532>.
- [136] K.A. Rye, P.J. Barter, Formation and Metabolism of Prebeta-Migrating, Lipid-Poor Apolipoprotein A-I, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 421–428. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000104029.74961.f5>.
- [137] M.N. Nanjee, E.A. Brinton, Very small apolipoprotein A-I-containing particles from human plasma: Isolation and quantification by high-performance size-exclusion chromatography, *Clin. Chem.* 46 (2000) 207–223. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.2.207>.
- [138] Y.Q. Wong, K.J. Binger, G.J. Howlett, M.D.W. Griffin, Methionine oxidation induces amyloid fibril formation by full-length apolipoprotein A-I, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 1977–1982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910136107>.
- [139] L. Zheng, B. Nukuna, M.L. Brennan, M. Sun, M. Goormastic, M. Settle, D. Schmitt, X. Fu, L. Thomson, P.L. Fox, H. Ischiropoulos, J.D. Smith, M. Kinter, S.L. Hazen, Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and function impairment in subjects with cardiovascular disease, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 529–541. <https://doi.org/10.1172/JCI200421109>.
- [140] J.O. Lagerstedt, M.S. Budamagunta, G.S. Liu, N.C. DeValle, J.C. Voss, M.N. Oda, The “beta-clasp” model of apolipoprotein A-I—a lipid-free solution structure determined by electron paramagnetic resonance spectroscopy., *Biochim. Biophys. Acta.* 1821 (2012) 448–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2011.12.010>.
- [141] P. Burnham Kenneth, R. Anderson David, Kullback-Leibler information as a basis for strong inference in ecological studies, *Wildl. Res.* 28 (2001) 111–119. <https://doi.org/10.1071/WR99107>.
- [142] D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov, H.J. Wolfson, PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 363–367. <https://doi.org/10.1093/nar/gki481>.
- [143] A. Tovchigrechko, I.A. Vakser, GRAMM-X public web server for protein-protein docking, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 310–314. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl206>.
- [144] B. Jiménez-García, C. Pons, J. Fernández-Recio, pyDockWEB: A web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring, *Bioinformatics.* 29 (2013) 1698–1699. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt262>.
- [145] M. Torchala, I.H. Moal, R.A.G. Chaleil, J. Fernandez-Recio, P.A. Bates, SwarmDock: A server for flexible protein-protein docking, *Bioinformatics.* 29 (2013) 807–809. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt038>.
- [146] E. Ramírez-Aportela, J. Ramón López-Blanco, P. Chacón, FRODOCK 2.0: Fast Protein-Protein docking server, *Struct. Bioinforma.* 32 (2016) 2386–2388. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw141>.
- [147] G. Weng, E. Wang, Z. Wang, H. Liu, F. Zhu, D. Li, T. Hou, HawkDock: a web server to predict and analyze the protein-protein complex based on computational docking and MM/GBSA, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) W322–W330. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz397>.
- [148] Y. Yan, H. Tao, J. He, S.Y. Huang, The HDock server for integrated protein–protein docking, *Nat. Protoc.* 15 (2020) 1829–1852. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x>.
- [149] J.D. Toledo, E.D. Prieto, M.C. Gonzalez, J.L. Soulages, H.A. Garda, Functional independence of a peptide with the sequence of human apolipoprotein A-I central region, *Arch. Biochem. Biophys.* 428 (2004) 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.05.009>.
- [150] C. Vedhachalam, P.T. Duong, M. Nickel, D. Nguyen, P. Dhanasekaran, H. Saito, G.H. Rothblat, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, 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.* 282 (2007) 25123–25130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704590200>.
- [151] M. Kono, Y. Okumura, M. Tanaka, D. Nguyen, P. Dhanasekaran, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, H. Saito, Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I bound to spherical lipid particles., *Biochemistry.* 47 (2008) 11340–11347. <https://doi.org/10.1021/bi801503r>.
- [152] A.L. Cooke, J. Morris, J.T. Melchior, S.E. Street, W.G. Jerome, R. Huang, A.B. Herr, L.E. Smith, J.P. Segrest, A.T. Remaley, A.S. Shah, T.B. Thompson, W.S. Davidson, A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL, *J. Lipid Res.* 59 (2018) 1244–1255. <https://doi.org/10.1194/jlr.M085332>.

- [153] D. Handa, H. Kimura, T. Oka, Y. Takechi, K. Okuhira, M.C. Phillips, H. Saito, Kinetic and thermodynamic analyses of spontaneous exchange between high-density lipoprotein-bound and lipid-free apolipoprotein A-I, *Biochemistry*. 54 (2015) 1123–1131. <https://doi.org/10.1021/bi501345j>.
- [154] G. Cavigiolio, E.G. Geier, B. Shao, J.W. Heinecke, M.N. Oda, Exchange of apolipoprotein A-I between lipid-associated and lipid-free states: a potential target for oxidative generation of dysfunctional high density lipoproteins, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 18847–18857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098434>.
- [155] J.K. Bielicki, M.R. McCall, T.M. Forte, Apolipoprotein A-I promotes cholesterol release and apolipoprotein E recruitment from THP-1 macrophage-like foam cells, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 85–92. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)33342-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)33342-3).
- [156] L. Liu, A.E. Bortnick, M. Nickel, P. Dhanasekaran, P. V Subbaiah, S. Lund-Katz, G.H. Rothblat, M.C. Phillips, Effects of apolipoprotein A-I on ATP-binding cassette transporter A1-mediated efflux of macrophage phospholipid and cholesterol: formation of nascent high density lipoprotein particles., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 42976–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308420200>.
- [157] P.T. Duong, G.L. Weibel, S. Lund-Katz, G.H. Rothblat, M.C. Phillips, Characterization and properties of pre $\beta$ -HDL particles formed by ABCA1-mediated cellular lipid efflux to apoA-I, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1006–1014. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700506-JLR200>.
- [158] R. Omura, K. Nagao, N. Kobayashi, K. Ueda, H. Saito, Direct detection of ABCA1-dependent HDL formation based on lipidation-induced hydrophobicity change in apoA-I, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 2423–2431. <https://doi.org/10.1194/jlr.D049445>.
- [159] W.A. Tárraga, L.J. Falomir-Lockhart, H.A. Garda, M.C. González, Analysis of pyrene-labelled apolipoprotein A-I oligomerization in solution: Spectra deconvolution and changes in P-value and excimer formation, *Arch. Biochem. Biophys.* 699 (2021) 108748. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108748>.
- [160] S. Jayaraman, C. Haupt, O. Gursky, Thermal transitions in serum amyloid A in solution and on the lipid: implications for structure and stability of acute-phase HDL., *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1531–1542. <https://doi.org/10.1194/jlr.M059162>.
- [161] G. Healthcare, Affinity media IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow, n.d.
- [162] R. Lamed, R. Kenig, E. Morag, S. Yaron, Y. Shoham, E.A. Bayer, Nonproteolytic cleavage of aspartyl proline bonds in the cellulosomal scaffoldin subunit from *Clostridium thermocellum*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 90 (2001) 67–73. <https://doi.org/10.1385/abab:90:1:67>.
- [163] C.W. Wu, L.R. Yarbrough, F.Y.H. Wu, N-(1-Pyrene)maleimide: A Fluorescent Cross-Linking Reagent, *Biochemistry*. 15 (1976) 2863–2868. <https://doi.org/10.1021/bi00658a025>.
- [164] J.I. Gallea, M.S. Celej, Structural insights into amyloid oligomers of the Parkinson disease-related protein  $\alpha$ -synuclein, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 26733–26742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566695>.
- [165] R.J. Randall, A. Lewis, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 1 (1951) 265–275.
- [166] H.I. Kwon, T. Kim, J.J. Seo, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of thhe Head of Bacteriophage T4, *Adv. Stud. Contemp. Math.* 26 (2016) 299–305. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [167] C. Huang, T.E. Thompson, Preparation of homogeneous, single-walled phosphatidylcholine vesicles, *MethodsEnzymol.* 32 (1974) 485–489. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)32048-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)32048-4).
- [168] J. Storch, A.M. Kleinfeld, Transfer of long-chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles, *Biochemistry*. 25 (1986) 1717–1726. <https://doi.org/10.1021/bi00355a041>.
- [169] B.N. Ames, D.T. Dubin, The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 769–775. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)67936-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)67936-6).
- [170] M.M.S. and D.W. Bolen, Unfolding Free Energy Changes Determined by the Linear Extrapolation Method . 1 . Unfolding of Phenylmethanesulfonyl alfa-Chymotrypsin Using Different Denaturants, *Biochemistry*. 27 (1988) 8063–8068. <https://doi.org/10.1021/bi00421a014>.
- [171] D. Djikanović, A. Kalauzi, K. Radotić, C. Lapiere, M. Jeremić, Deconvolution of lignin fluorescence spectra: A contribution to the comparative structural studies of lignins, *Russ. J. Phys. Chem. A.* 81 (2007) 1425–1428. <https://doi.org/10.1134/S0036024407090142>.
- [172] M. Bacalum, B. Zorila, M. Radu, Fluorescence spectra decomposition by asymmetric functions: Laurdan spectrum revisited, *Anal. Biochem.* 440 (2013) 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.05.031>.

## BIBLIOGRAFÍA

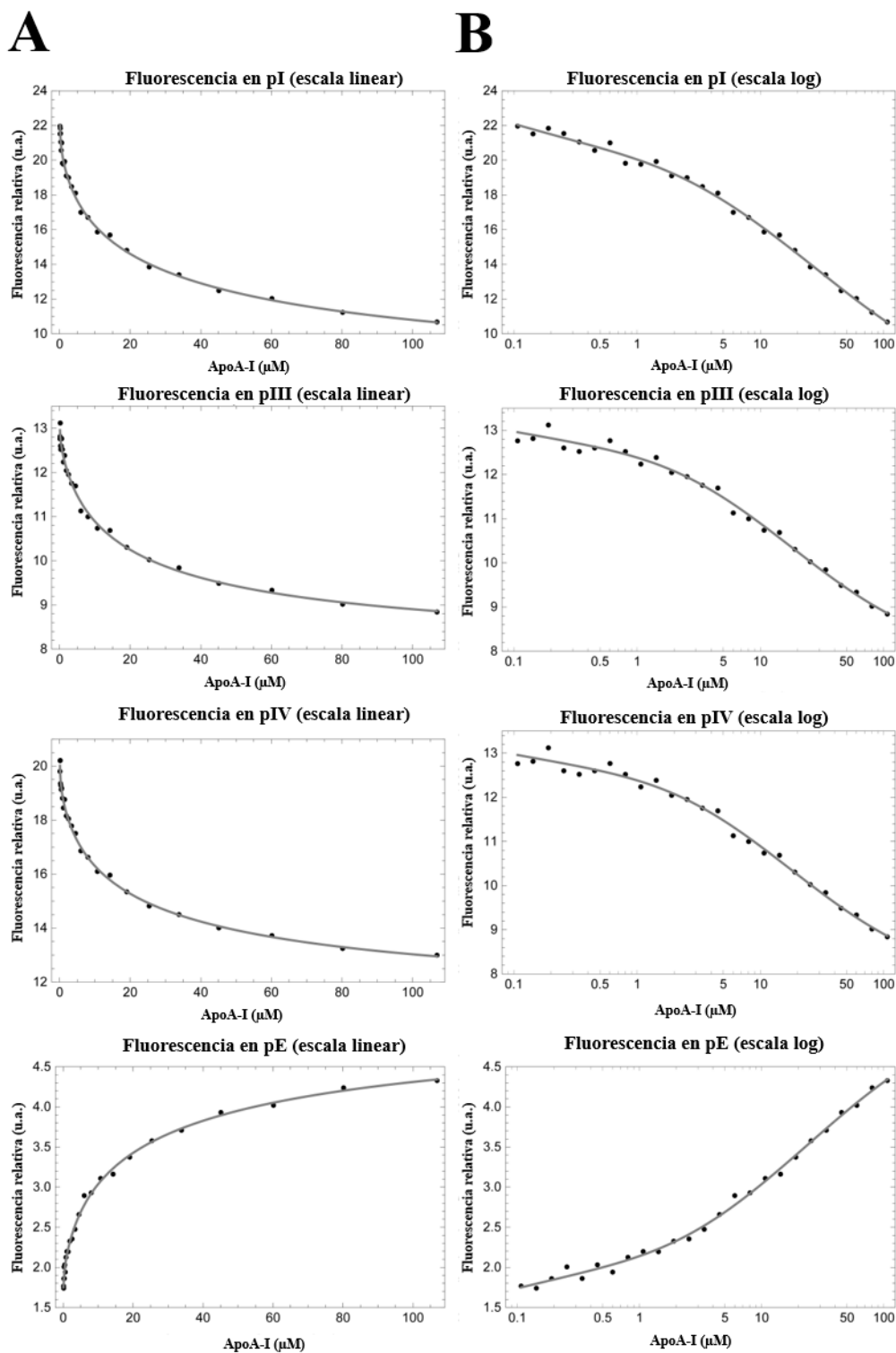
---

- [173] G.K. Smyth, Pearson's Goodness of Fit Statistic as a Score Test Statistic, *Inst. Math. Stat. Lect. Notes - Monogr. Ser.* 40 (2003) 115–126. <https://doi.org/10.1214/Inms/1215091138>.
- [174] R. Reilly, *Information Theory and and Extension of the Maximum Likelihood Principle*, n.d.
- [175] N. Sugiura, Further analysis of the fata by Anaike's Information criterion and the finite corrections, *Commun. Stat. - Theory Methods.* 7 (1978) 13–26. <https://doi.org/10.1080/03610927808827599>.
- [176] G. Schwarz, Estimating the dimension of a model, *Ann. Stat.* 6 (1978) 461–464. <https://www.jstor.org/stable/2958889>.



# **ANEXO**

Esta página se encuentra en blanco



**Figura A.1: Ajuste a un modelo de asociación múltiple.** Datos experimentales fueron ajustados a un modelo M1\_A8E3. A) y B), escala lineal y logarítmica.

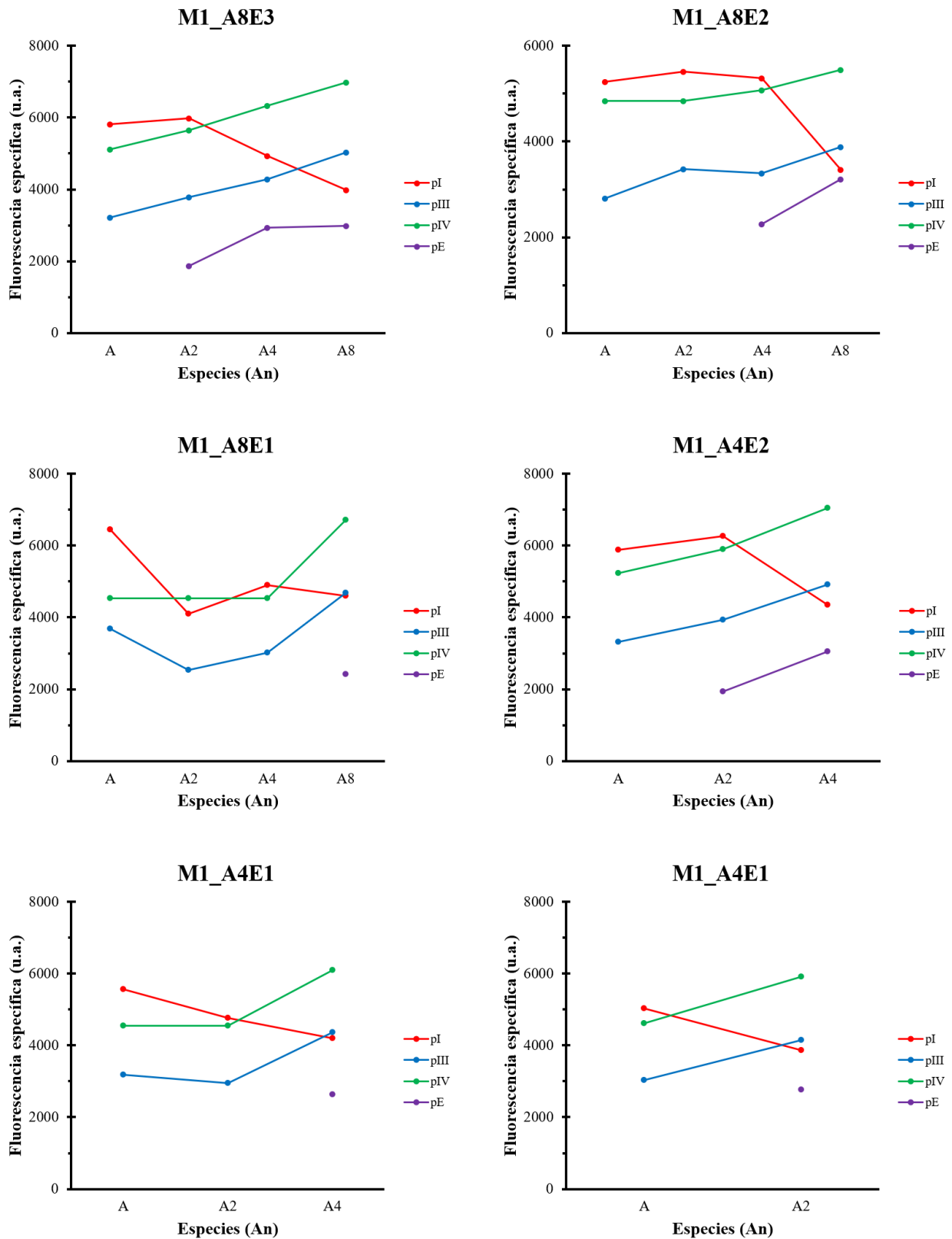


Figura A.2: Fluorescencias específicas para M1\_A8E3.

Tabla A.1: Constantes de asociación calculadas con K133C-NPM

Modelo	Esquema	$K_A1/\mu M_{dim} \cdot \mu M_{mon}^{-2}$	$K_A2^*$	$K_A3^*$	
M1	M1_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$5 \pm 3$	$0,14 \pm 0,05^b$	$0,09 \pm 0,08^b$
	M1_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$5 \pm 3^a$	$5 \pm 3^a$	$0,11 \pm 0,02$
	M1_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$8 \pm 3^a$	$8 \pm 3^a$	$0,24 \pm 0,05$
	M1_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$5 \pm 3$	$0,05 \pm 0,01$	(n.a.)
	M1_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$8 \pm 3$	$0,09 \pm 0,01$	(n.a.)
	M1_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,047 \pm 0,003$	(n.a.)	(n.a.)
M2	M2_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	$6 \pm 2$	$3 \pm 2$	$0,04 \pm 0,05$
	M2_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	$7 \pm 2$	$6 \pm 2$	$0,2 \pm 0,1$
	M2_A8E1 <sup>c</sup>	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	$3 \pm 1^a$	$2 \pm 2^{a,b}$	$0,5 \pm 0,4^{a,b}$
	M2_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	$5 \pm 3$	$2 \pm 2$	(n.a.)
	M2_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	$8 \pm 3$	$6 \pm 3$	(n.a.)
	M2_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,047 \pm 0,003$	(n.a.)	(n.a.)
M3	M3_A8E7	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_8$	$0,5 \pm 0,1$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A7E6	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_7$	$0,42 \pm 0,06$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A6E5	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_6$	$0,38 \pm 0,06$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A5E4	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_5$	$0,27 \pm 0,03$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A4E3	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_4$	$0,23 \pm 0,03$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A3E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_3$	$0,09 \pm 0,02$	(n.a.)	(n.a.)
M3_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,047 \pm 0,003$	(n.a.)	(n.a.)	
M4	M4_A8E4	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$5 \pm 3$	$0,100 \pm 0,004$	(n.a.)
	M4_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$8 \pm 3$	$0,37 \pm 0,05$	(n.a.)
	M4_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$8 \pm 3$	$0,81 \pm 0,06$	(n.a.)
	M4_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$8 \pm 3$	$1,01 \pm 0,06$	(n.a.)
	M4_A6E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	$5 \pm 3$	$0,08 \pm 0,03$	(n.a.)
	M4_A6E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	$8 \pm 3$	$0,17 \pm 0,01$	(n.a.)
	M4_A6E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	$8 \pm 3$	$0,43 \pm 0,03$	(n.a.)
	M4_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$5 \pm 3$	$0,05 \pm 0,01$	(n.a.)
M4_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$8 \pm 3$	$0,09 \pm 0,01$	(n.a.)	
M4_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,047 \pm 0,003$	(n.a.)	(n.a.)	

Los valores de  $K_A$  son presentados como su promedio  $\pm$  error estándar por triplicado. En cursiva se resaltan aquellos valores de  $K_A$  que en al menos una de sus repeticiones iguala la cota superior que actúa como restricción (inversa del valor mínimo de concentración). En rojo se resaltan aquellos sub-modelos que en al menos una de sus repeticiones no muestran un comportamiento esperado en sus fluorescencias específicas, o una distribución de residuos uniforme. En azul se resalta el sub-modelo que mejor reproduce los datos experimentales. <sup>(a)</sup> y <sup>(b)</sup> Con estos valores de  $K_A$ , en al menos una de sus repeticiones, no se cumplen las restricciones  $K_A1 > K_A2$  y/o  $K_A2 > K_A3$ , respectivamente (se obtiene una igualdad entre sus valores). <sup>(c)</sup> Con este sub-modelo no se logra ajustes coherentes de los datos experimentales. <sup>(\*)</sup> Unidades de  $K_A$  expresadas en función de su definición (ver **Tabla 4.3**). (n.a.), no aplicable.

Tabla A.2: Selección de modelos con F225C-NPM

Modelo <sup>a</sup>	Esquema <sup>a</sup>	Parámetros <sup>b</sup>	SSE <sup>c</sup>	$\Delta AIC$ <sup>d</sup>	$\Delta AICc$ <sup>d</sup>	$\Delta BIC$ <sup>d</sup>	Distribución de residuos <sup>e</sup>	Comportamiento de parámetros <sup>f</sup>	
M1	M1_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	22	13,74	4	6	10	Aceptable	Aceptable
	M1_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	20	13,74	0	0	0	Aceptable	Aceptable
	M1_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	18	21,19	106	104	100	No aceptable	(n.a.)
	M1_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	16	18,39	48	45	37	Aceptable	Aceptable
	M1_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	14	21,67	111	107	94	No aceptable	(n.a.)
	M1_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	10	21,64	130	123	101	No aceptable	(n.a.)
M2	M2_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	22	13,90	7	9	13	Aceptable	Aceptable
	M2_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	20	20,49	86	86	86	No aceptable	(n.a.)
	M2_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	18	27,62	161	159	155	No aceptable	(n.a.)
	M2_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	16	18,39	48	45	37	Aceptable	Aceptable
	M2_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	14	21,67	111	107	94	No aceptable	(n.a.)
	M2_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	10	21,64	130	123	101	No aceptable	(n.a.)
M3	M3_A8E7	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_8$	40	13,13	36	69	92	Aceptable	No aceptable
	M3_A7E6	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_7$	35	13,44	29	50	71	Aceptable	No aceptable
	M3_A6E5	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_6$	30	13,86	24	36	52	Aceptable	No aceptable
	M3_A5E4	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_5$	25	14,28	20	25	34	Aceptable	No aceptable
	M3_A4E3	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_4$	20	16,19	32	32	32	Aceptable	No aceptable
	M3_A3E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_3$	15	17,20	32	28	17	Aceptable	No aceptable
	M3_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	10	21,64	130	123	101	No aceptable	(n.a.)
M4	M4_A8E4	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	26	14,27	23	30	40	Aceptable	No aceptable
	M4_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	24	14,25	19	24	31	Aceptable	No aceptable
	M4_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	22	15,71	28	30	34	Aceptable	No aceptable
	M4_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	20	18,55	87	87	87	No aceptable	(n.a.)
	M4_A6E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	21	18,26	59	60	62	Aceptable	Aceptable
	M4_A6E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	19	17,53	49	48	46	Aceptable	No aceptable
	M4_A6E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	17	19,97	98	95	89	No aceptable	(n.a.)
	M4_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	16	18,39	48	45	37	Aceptable	Aceptable
	M4_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	14	21,67	111	107	94	No aceptable	(n.a.)
M4_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	10	21,64	130	123	101	No aceptable	(n.a.)	

La tabla describe el análisis con la variante F225C-NPM y cuatro modelos de asociación múltiple. Se muestran los resultados para un set de datos experimentales de 31 espectros. <sup>(a)</sup> Modelo y esquema de asociación. <sup>(b)</sup> Número total de parámetros para cada sub-modelo. <sup>(c)</sup> Bondad del ajuste evaluada a través de la suma total de residuos (SSE·1000). Los criterios  $R^2$  y  $R^2$ Ajustado reportaron valores similares alrededor de 0,99 (datos no mostrados en la tabla). <sup>(d)</sup> Criterios de información AIC, AICc y BIC expresados como diferencias respecto a su valor mínimo. <sup>(e)</sup> Confianza en la distribución de residuos a lo largo de la titulación registrada en sus cuatro ventanas. <sup>(f)</sup> Confianza en los parámetros obtenidos, donde se asigna (n.a.), no aplicable cuando no hay un ajuste adecuado. En todos los modelos se cumple  $N > p + 2$ , donde  $N$  indica el número de datos experimentales (4 veces los espectros adquiridos, en nuestro caso 124) y  $p$  el número de parámetros, condición requerida para utilizar el AICc. Para seguir el análisis se utiliza un gradiente de color entre rojo y verde, verde: valor esperado y rojo: valor inesperado.

Tabla A.3: Constantes de asociación calculadas con F225C-NPM

	Modelo	Esquema	$K_A1/\mu M_{dim} \cdot \mu M^{-2}_{mon}$	$K_A2^*$	$K_A3^*$
M1	M1_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$1 \pm 1^a$	$1 \pm 1^a$	$0,05 \pm 0,03$
	M1_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$1,9 \pm 0,7^a$	$1,9 \pm 0,7^a$	$0,06 \pm 0,02$
	M1_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$4,916 \pm 0,009^a$	$4,92 \pm 0,01^a$	$0,45 \pm 0,09$
	M1_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$0,15 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	(n.a.)
	M1_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$1,6 \pm 0,8^a$	$0,3 \pm 0,1^a$	(n.a.)
	M1_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,10 \pm 0,01$	(n.a.)	(n.a.)
M2	M2_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	$0,9 \pm 0,8^a$	$0,8 \pm 0,7^a$	$0,003 \pm 0,002$
	M2_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	$2,3 \pm 0,5^a$	$2,0 \pm 0,3^a$	$0,015 \pm 0,008$
	M2_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	$0,37 \pm 0,01^a$	$0,37 \pm 0,01^a$	$0,14 \pm 0,04$
	M2_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	$0,15 \pm 0,03$	$0,001 \pm 0,001$	(n.a.)
	M2_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	$1,6 \pm 0,8$	$0,8 \pm 0,6$	(n.a.)
	M2_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,10 \pm 0,01$	(n.a.)	(n.a.)
M3	M3_A8E7	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_8$	$1,0 \pm 0,4$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A7E6	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_7$	$0,9 \pm 0,2$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A6E5	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_6$	$0,6 \pm 0,3$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A5E4	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_5$	$0,6 \pm 0,3$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A4E3	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_4$	$0,4 \pm 0,2$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A3E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_3$	$0,13 \pm 0,02$	(n.a.)	(n.a.)
	M3_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,10 \pm 0,01$	(n.a.)	(n.a.)
M4	M4_A8E4	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$2 \pm 2$	$0,3 \pm 0,2$	(n.a.)
	M4_A8E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$4,92 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,04$	(n.a.)
	M4_A8E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$4,916 \pm 0,009$	$1,0 \pm 0,1$	(n.a.)
	M4_A8E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$4,86 \pm 0,06$	$1,5 \pm 0,2$	(n.a.)
	M4_A6E3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	$0,14 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,05$	(n.a.)
	M4_A6E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	$4,915 \pm 0,009$	$0,46 \pm 0,09$	(n.a.)
	M4_A6E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	$4,916 \pm 0,009$	$0,7 \pm 0,1$	(n.a.)
	M4_A4E2	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$0,15 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	(n.a.)
	M4_A4E1	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$1,6 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,1$	(n.a.)
M4_A2E1	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,10 \pm 0,01$	(n.a.)	(n.a.)	

Los valores de  $K_A$  son presentados como su promedio  $\pm$  error estándar por triplicado. En cursiva se resaltan aquellos valores de  $K_A$  que en al menos una de sus repeticiones iguala la cota superior que actúa como restricción (inversa del valor mínimo de concentración). En rojo se resaltan aquellos sub-modelos que en al menos una de sus repeticiones no muestran un comportamiento esperado en sus fluorescencias específicas, o una distribución de residuos uniforme. En azul se resalta el sub-modelo que mejor reproduce los datos experimentales. <sup>(a)</sup> Con estos valores de  $K_A$ , en al menos una de sus repeticiones, no se cumple la restricción  $K_A1 > K_A2$  (se obtiene una igualdad entre sus valores). <sup>(\*)</sup> Unidades de  $K_A$  expresadas en función de su definición (ver **Tabla 4.3**). (n.a.), no aplicable.

Tabla A.4: Selección de modelos con K107C-NPM

Modelo <sup>a</sup>	Esquema <sup>a</sup>	Parámetros <sup>b</sup>	SSE <sup>c</sup>	$\Delta AIC$ <sup>d</sup>	$\Delta AICc$ <sup>d</sup>	$\Delta BIC$ <sup>d</sup>	Distribución de residuos <sup>e</sup>	Comportamiento de parámetros <sup>f</sup>	
M1	M1_A8	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	11	9,96	11	16	23	Aceptable	Aceptable
	M1_A4	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	8	9,98	4	6	10	Aceptable	Aceptable
	M1_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	5	10,44	0	0	0	Aceptable	Aceptable
M2	M2_A8	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	11	9,53	6	11	18	Aceptable	Aceptable
	M2_A4	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	8	9,97	2	4	8	Aceptable	Aceptable
	M2_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	5	10,44	0	0	0	Aceptable	Aceptable
M3	M3_A8	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_8$	17	9,74	21	36	46	Aceptable	No aceptable
	M3_A7	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_7$	15	9,74	16	27	37	Aceptable	No aceptable
	M3_A6	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_6$	13	9,84	11	18	27	Aceptable	No aceptable
	M3_A5	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_5$	11	9,48	6	11	18	Aceptable	No aceptable
	M3_A4	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_4$	9	9,93	4	6	12	Aceptable	Aceptable
	M3_A3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_3$	7	10,06	0	1	4	Aceptable	Aceptable
M4	M4_A8	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	12	8,88	5	11	19	Aceptable	No aceptable
	M4_A6	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	10	9,99	9	13	19	Aceptable	Aceptable
	M4_A4	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	8	9,98	4	6	10	Aceptable	Aceptable
	M4_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	5	10,44	0	0	0	Aceptable	Aceptable

La tabla describe el análisis con la variante K107C-NPM y cuatro modelos de asociación múltiple. Se muestran los resultados para un set de datos experimentales de 30 espectros. <sup>(a)</sup> Modelo y esquema de asociación. <sup>(b)</sup> Número total de parámetros para cada sub-modelo. <sup>(c)</sup> Bondad del ajuste evaluada a través de la suma total de residuos (SSE·1000). Los criterios  $R^2$  y  $R^2$ Ajustado reportaron valores similares alrededor de 0,99 (datos no mostrados en la tabla). <sup>(d)</sup> Criterios de información AIC, AICc y BIC expresados como diferencias respecto a su valor mínimo. <sup>(e)</sup> Confianza en la distribución de residuos a lo largo de la titulación registrada en sus cuatro ventanas. <sup>(f)</sup> Confianza en los parámetros obtenidos, donde se asigna (n.a.), no aplicable cuando no hay un ajuste adecuado. En todos los modelos se cumple  $N > p + 2$ , donde  $N$  indica el número de datos experimentales (2 veces los espectros adquiridos, en nuestro caso 60) y  $p$  el número de parámetros, condición requerida para utilizar el AICc. Para seguir el análisis se utiliza un gradiente de color entre rojo y verde, verde: valor esperado y rojo: valor inesperado.



Tabla A.5: Constantes de asociación calculadas con K107C-NPM

Modelo	Esquema	$K_A1/\mu M_{dim} \cdot \mu M_{mon}^{-2}$	$K_A2^*$	$K_A3^*$
M1_A8	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_8$	$0,1 \pm 0,1^a$	$0,1 \pm 0,1^{a,b}$	$0,02 \pm 0,01^{a,b}$
M1_M1_A4	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$3 \pm 2$	$0,03 \pm 0,02$	(n.a.)
M1_M1_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,010 \pm 0,001$	(n.a.)	(n.a.)
M2_A8	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4; A \rightleftharpoons A_8$	$5,2 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,6$	$0,002 \pm 0,001$
M2_M2_A4	$A \rightleftharpoons A_2; A \rightleftharpoons A_4$	$4 \pm 2$	$0,5 \pm 0,4$	(n.a.)
M2_M2_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,010 \pm 0,001$	(n.a.)	(n.a.)
M3_A8	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_8$	$0,1 \pm 0,1$	(n.a.)	(n.a.)
M3_A7	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_7$	$0,1 \pm 0,1$	(n.a.)	(n.a.)
M3_A6	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_6$	$0,13 \pm 0,06$	(n.a.)	(n.a.)
M3_M3_A5	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_5$	$0,20 \pm 0,07$	(n.a.)	(n.a.)
M3_M3_A4	$A \rightleftharpoons (A_n) \rightleftharpoons A_4$	$0,12 \pm 0,02$	(n.a.)	(n.a.)
M3_M3_A3	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_3$	$0,07 \pm 0,05$	(n.a.)	(n.a.)
M3_M3_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,010 \pm 0,001$	(n.a.)	(n.a.)
M4_A8	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6 \rightleftharpoons A_8$	$4 \pm 2$	$0,2 \pm 0,1$	(n.a.)
M4_M4_A6	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4 \rightleftharpoons A_6$	$2 \pm 2$	$0,06 \pm 0,03$	(n.a.)
M4_M4_A4	$A \rightleftharpoons A_2 \rightleftharpoons A_4$	$3 \pm 2$	$0,03 \pm 0,02$	(n.a.)
M4_M4_A2	$A \rightleftharpoons A_2$	$0,010 \pm 0,001$	(n.a.)	(n.a.)

Los valores de  $K_A$  son presentados como su promedio  $\pm$  error estándar por triplicado. En cursiva se resaltan aquellos valores de  $K_A$  que en al menos una de sus repeticiones iguala la cota superior que actúa como restricción (inversa del valor mínimo o máximo de concentración). En rojo se resaltan aquellos sub-modelos que en al menos una de sus repeticiones no muestran un comportamiento esperado en sus fluorescencias específicas, o una distribución de residuos uniforme. En azul se resalta el sub-modelo que mejor reproduce los datos experimentales. (\*) Unidades de  $K_A$  expresadas en función de su definición (ver **Tabla 4.3**). (a) y (b) Con estos valores de  $K_A$ , en al menos una de sus repeticiones, no se cumplen las restricciones  $K_A1 > K_A2$  y/o  $K_A2 > K_A3$ , respectivamente (se obtiene una igualdad entre sus valores). (n.a.), no aplicable.