

RESPUESTAS CELULARES A K107DEL,  
UNA MUTANTE NATURAL DE  
APOLIPOPROTEÍNA A-I HUMANA CON  
INCREMENTADO RIESGO  
ATEROGÉNICO



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

Tesis doctoral  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de La Plata  
Año 2021

Autor: Lic. Ivo Díaz Ludovico

Directora: Dra. Marina Cecilia Gonzalez

Co-Director: Dr. Horacio Alberto Garda

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. Marina Cecilia Gonzalez y la co-dirección del Dr. Horacio Alberto Garda.

## Agradecimientos:

En primer lugar, agradezco a mis directores la Dra. Marina Gonzalez y el Dr. Horacio Garda, por aceptarme para realizar el Doctorado y ofrecerme la libertad de llevar a cabo los experimentos que fueron necesarios para desarrollar esta Tesis. A Horacio por su enseñanza para los experimentos de fluorescencia, las recomendaciones y su paciencia; a Marina por el seguimiento en los experimentos celulares.

Al INIBIOLP y su director (el Dr. Garda) por recibirme y brindarme acceso a las instalaciones y equipos.

Le agradezco a Ale con el corazón, me sobran los motivos... por introducirme al mundo de la biofísica, por su consejo, por las charlas y por amenizar el trabajo que a veces se tornó muy duro. Por su empuje, por invitarme a formar parte de las Pasantías para los Estudiantes, por ayudarme a transformar los resultados en producción y así muchas líneas más...

A Nahuel, mi colega. Aprendí de él sobre ciencia, pero sobre todo, como sobrellevar con calma los experimentos (bueno mentira, no lo aprendí aun), las gratas conversaciones y su amistad.

A Sil por su hermosa amistad, charlas, y su buena onda.

A Aldi, mi amiga... que decir... gracias por tu alegría, por la escucha, y tu ayuda para desdramatizar situaciones.

Al Dr. Sebastián Trejo, que desinteresadamente me brindó consejo y asesoramiento para estructurar los análisis de proteómica celular.

A Romi Becerra... temeraria domadora de la técnica conocida como "Western blot". Pero además por su grata amistad y por su buena predisposición para tender una mano (bueno en realidad varias) cuando hizo falta. A Romi Vazquez y Sabina por ayudarme con los experimentos de monocapas y sus charlas y su macanudez. A Romi Gisonno por meterle pilas a la producción y la buena predisposición. A Gabi por su ayuda con las células. A Guillermo Schinella por los inhibidores. A Mabel (cuya labor es indispensable para el INIBIOLP), y a todo el personal de INIBIOLP: al trabajo clave de Marcelo, Marcia y Mariana. A Rosana por las traducciones y a Mario por los diseños y edición de imágenes.

Agradeceré asado mediante a mis amigos y familia. A mi papá Raúl, a mis amigos Nico, Fran, Aaron, Naza y Betsa.

A mi compañera de vida Trini, porque nos acompañamos y sostuvimos todos estos años en los que crecimos juntos. Y por este último tirón.

Por el financiamiento: al MINCyT, a la CIC (Provincia de Bs. As.), al CONICET, a la IUBMB. Sobre todo, a la Sociedad Argentina que, como componente del estado, financió/amos este trabajo y posibilitó/amos la existencia del CONICET, que es nuestro Orgullo Nacional.

*La vida no es otra cosa que arder en preguntas.*

*“La vie est de brûler des questions”*

*A. Artaud*



¿Dónde encontrar el sentido de las cosas? En ningún sitio y en ningún pensamiento.

El sentido no es un fin, sino un medio: el medio para transitar el mundo. No hemos de preguntarnos el sentido, pues no lo hay. Sin embargo, hay flores, hay vino, hay amistades, hay horrores y hay espanto. Por esto, caminemos lejos de algunos sentidos y sinsentidos, pero bien cerca de otros. Dejemos estela de bien -el mal suele disfrazarse de errores, omisiones y sinquereres- y hagamos de este mundo una alegría para nosotros y los otros. Pues de la nada, nada se salva y nada quedará. Pero la alegría y plenitud resonarán por siempre como un recuerdo feliz o una montaña... hasta que finalmente desaparezcan. Este camino sin sentido traza el fin y el medio al futuro y al presente, para sentir la vida sin cuestionarla tanto. Dejando *esa* estela de bien y fulgores, y agitando la empatía como estandarte.

*La ciencia no es neutral y debe ser construida para dar felicidad a las personas, no muerte ni malestar.*

*Este es nuestro edicto ético.*

# ABREVIATURAS

---

ApoA-I	Apolipoproteína A-I humana
ApoA-I <sup>K107del</sup>	Mutante de delección de apoA-I humana
BS <sup>3</sup>	Bis(sulfosuccinimidil)suberato
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL	Colesterol asociado a la HDL
CMs	Quilomicrones
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
K107del	Mutante de delección de apoA-I recombinante
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LUV	Liposomas unilamelares
MLV	Liposomas multilamelares
MMP	Matriz metaloproteinasas
nLDL	LDL nativas
ox-	Sufijo que indica oxidación
oxLDL	LDL oxidadas
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPC	1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina
PTM	Modificaciones post traduccionales
PTMs	Modificaciones postraduccionales
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RPMI (ss)	RPMI sin suero fetal bobino
RPMI	Medio de cultivo RPMI 1640
SUV	Liposomas unilamelares pequeños
TRC	Transporte reverso del colesterol
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
Wt	Apolipoproteína A-I humana recombinante

# RESUMEN

---

En este trabajo de Tesis se realizó la investigación exhaustiva de la mutante denominada K107del, una variante natural de apolipoproteína A-I (apoA-I) con una única delección de la lisina en la posición 107 mediante espectrometría de masas, proteómica comparativa, y diversos estudios de interacción proteína/lípido. La apoA-I es la proteína mayoritaria de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), aunque también se encuentra en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y quilomicrones (CMs). Entre sus diversas funciones la principal y mejor descrita es su rol en el transporte reverso del colesterol, proceso clave para la prevención de la aterosclerosis. Desde su descubrimiento, la K107del se asoció con la predisposición a desarrollar diversas patologías en sus portadores tales como aterosclerosis temprana y severa, hipertrigliceridemia y amiloidosis. Sin embargo, hasta hoy son desconocidas las causas moleculares que generan su efecto fisiopatológico. El objetivo de este trabajo fue examinar los potenciales defectos funcionales y/o estructurales que podrían explicar la aparente disfunción de esta variante. Se caracterizó entonces a la K107del utilizando diversos métodos biofísicos y biológicos, analizando los aspectos estructurales de esta variante tanto como su función celular y su capacidad de interacción con lípidos. Para ello se realizaron experimentos de proteómica comparativa sin marca radiactiva y experimentos con lípidos modelo; asimismo se llevaron a cabo análisis estructurales utilizando el agente entrecruzante BS<sup>3</sup>, seguido de análisis por espectrometría de masas, complementados por técnicas de fluorescencia. Los resultados obtenidos demuestran que no existen diferencias significativas entre K107del y Wt en su capacidad para interaccionar con lípidos. Tampoco se observaron diferencias significativas en la capacidad de estas proteínas de modificar los niveles de expresión de proteínas celulares. Sin embargo, la K107del presenta una estructura terciaria diferente de la Wt y una menor tendencia a oligomerizar en su estado libre de lípidos. También se demostró en este trabajo, que la incubación de macrófagos humanos THP-1 con la Wt, resulta en la acumulación de la proteína multifuncional sequestosoma-1/p62 de manera dependiente de la vía antioxidante del factor nuclear eritroide-2 (vía Nrf2-Keap1). Sin



embargo, aunque la incubación con K107del también resultó en la acumulación de p62, ésta lo hizo de manera independiente a la vía Nrf2. Los hallazgos presentados en esta Tesis permiten concluir que los efectos patológicos observados para la variante K107del podrían ser explicados probablemente por su conformación tridimensional alterada, tanto como su incapacidad para oligomerizar y/o su posible respuesta celular diferenciada, comparativamente a la Wt.

# ABSTRACT

---

This work presents a comprehensive study of the mutant K107del, a natural variant of apoA-I, which has a single deletion on lysine 107. We have characterized this protein by mass spectroscopy, label-free comparative proteomics, and diverse biophysical techniques to evaluate the protein-lipids interaction. The apoA-I it's the major protein in the high-density lipoproteins (HDL), but it is also present in low-density lipoproteins (LDL) and chylomicrons (CMs). While apoA-I is a multifunctional protein, it pivotal role in reverse cholesterol transport (RCT) it's their most relevant function, preventing the atherosclerotic development. Since its discovery, the K107del variant has been associated with early and severe atherosclerosis, hypertriglyceridemia and amyloidosis on its carriers. However, the molecular explanation underlying it apparent misfunction remains unknown. The aim of this study was to investigate the possible structural and functional defects, suspected for this mutant. In this regard, the K107del was characterized by diverse biophysical and biological methods emphasizing on it structure and function. To this end label-free quantification proteomics, protein-lipid interaction assays, and crosslinking followed by mass spectrometry, and intrinsic fluorescence assays were performed. The outcomes shown here reflect that the deletion of lysine 107 do not impair alterations on lipids interaction nor overexpression of cellular proteins, compared to the Wt. But, third structure of K107del and it self-association capacity its profoundly altered in comparison to the Wt. Here we also demonstrated that both Wt and K107del are responsible of p62 accumulation by THP-1 macrophages until protein treatment. Thought, the p62 level due the Wt treatment was decreased by the inhibition of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2-Keap1 pathway), this effect was not observed in case of K107del thru inhibition of this pathway. These results support the concept that probably K107del defects could be explained by it altered conformation, it defective self-association capacity, and/or it differential cellular response, in comparison to the Wt protein.

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
----------------------	----------

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
-----------------------	-----------

## 1. INTRODUCCIÓN

<b>1.1. Apolipoproteína A-I: aspectos generales</b> .....	<b>17</b>
---	-----------

<b>1.2. Modelos estructurales vigentes para apoA-I</b> .....	<b>17</b>
--	-----------

1.2.1. Modelos estructurales de apoA-I libre de lípidos .....	17
---	----

1.2.2. Modelos estructurales de apoA-I lipídada .....	19
---	----

<b>1.3. Variantes naturales de apoA-I con relevancia clínica</b> .....	<b>20</b>
--	-----------

<b>1.4. Variante natural de apoA-I de delección de la lisina 107: ApoA-I<sup>K107del</sup></b> .....	<b>21</b>
--	-----------

<b>1.5. Fisiología y relevancia metabólica de la apoA-I</b> .....	<b>24</b>
---	-----------

<b>1.6. Relevancia fisiológica de apoA-I en seres humanos</b> .....	<b>26</b>
---	-----------

1.6.1. Enfermedad cardiovascular y apoA-I .....	26
---	----

1.6.2. Amiloidosis y apoA-I .....	28
-----------------------------------	----

1.6.3. Inflamación y apoA-I .....	28
-----------------------------------	----

1.6.4. COVID-19 y apoA-I .....	29
--------------------------------	----

<b>1.7. Implicancia estructural en la función fisiológica de apoA-I</b> .....	<b>30</b>
---	-----------

<b>1.8. Aspecto metabólico de apoA-I</b> .....	<b>31</b>
--	-----------

1.8.1. ApoA-I en el contexto celular .....	31
--	----

1.8.2. Vía antioxidante Nrf2 -Keap1 .....	32
---	----

<b>1.9. Fundamentos básicos de métodos y tecnologías específicas utilizadas</b> .....	<b>34</b>
---	-----------

1.9.1. Estrategias de estudio asociadas a la fluorescencia .....	34
--	----

1.9.2. Espectrometría de masas con tecnología orbitrap .....	36
--	----

1.9.3. Espectrometría de masas tipo Q-TOF con tecnología iFunnel.....	37
---	----

## 2. OBJETIVOS

<b>2.1. Objetivo general</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>39</b>

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>3.1. Técnicas generales</b> .....	<b>40</b>
3.1.1. Expresión de proteínas recombinantes.....	40
3.1.2. Purificación de proteínas recombinantes .....	40
3.1.3. Técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida .....	41
3.1.4. Electroforesis nativa (PAGE) .....	41
3.1.5. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) .....	42
3.1.6. Sistemas de detección de proteínas .....	42
<b>3.2. Técnicas para el cálculo de concentración proteica</b> .....	<b>43</b>
3.2.1. Midiendo la absorbancia a 280 nm .....	43
3.2.2. Mediante la técnica del ácido bicinorínico (BCA).....	43
<b>3.3. Análisis estadísticos</b> .....	<b>43</b>
<b>3.4. Técnicas utilizadas en los estudios celulares</b> .....	<b>44</b>
3.4.1. Técnicas de cultivo celular .....	44
3.4.2. Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos .....	45
3.4.3. Ensayos celulares con proteínas .....	45
3.4.4. Ensayos celulares con inductores e inhibidores de la vía Nrf2-Keap1.....	46
3.4.5. Extracción de proteínas celulares totales .....	46
<b>3.5. Determinación de proteínas diferencialmente expresadas mediante proteómica comparativa libre de marca radiactiva (LFQ)</b> .....	<b>47</b>
3.5.1. Obtención de espectros completos (MS/MS) mediante cromatografía líquida (LC) seguida por espectrometría de masas orbitrap .....	47
3.5.2. Asignación de identidad peptídica mediante el uso de softwares especializados.....	48
3.5.3. Análisis estadístico de las proteínas identificadas por orbitrap mediante t-test de dos muestras .....	49

3.5.4. Validación metodológica de las proteínas diferencialmente expresadas luego de los tratamientos con proteínas recombinantes .....	50
<b>3.6. Técnicas aplicadas para los estudios de biofísica funcional mediante la determinación de la interacción proteína/lípido .....</b>	<b>51</b>
3.6.1. Construcción de liposomas unilamelares (SUV) .....	51
3.6.2. Medidas de pérdida de contenido de SUV .....	51
3.6.3. Estudios realizados en monocapas lipídicas .....	52
3.6.4. Construcción de liposomas multilamelares (MLV) .....	53
3.6.5. Medidas de clarificación de turbidez del DMPC .....	53
3.6.6. Estudios de formación de complejos lipoproteicos y HDL reconstituidas (rHDL).....	53
3.6.7. Construcción de partículas lipoproteicas mediante micelización espontánea del DMPC .....	54
3.6.8. Construcción de partículas lipoproteicas asistida mediante uso de detergentes.....	54
3.6.9. Observaciones al microscopio electrónico de barrido (TEM) .....	55
<b>3.7. Ensayos con lipoproteínas plasmáticas .....</b>	<b>55</b>
3.7.1. Interacción de proteínas recombinantes con LDL nativas.....	55
3.7.2. Ensayos de interacción de LDL con células MOVAS preincubadas con proteínas.....	56
3.7.3. Ensayos de interacción de proteínas con fracciones plasmáticas completas...56	
<b>3.8. Entrecruzamiento proteico con bis[sulfosuccinimidil] suberato (BS<sup>3</sup>) .....</b>	<b>57</b>
3.8.1. Entrecruzamiento de proteínas monoméricas en estado nativo libre de lípidos.....	57
<b>3.9. Técnicas aplicadas para los estudios de biofísica estructural .....</b>	<b>58</b>
3.9.1. Entrecruzamiento de oligómeros de apoA-I de proteínas en estado nativo libre de lípidos .....	58
3.9.2. Medidas de fluorescencia intrínseca de triptófanos .....	58
3.9.3. Purificación de oligómeros de apoA-I entrecruzados .....	59
3.9.4. Análisis estructural de monómeros entrecruzados por LC-MS con tecnología iFunnel .....	59

3.9.5. Softwares especializados para en análisis de péptidos entrecruzados (xlinks).....	60
--	----

## 4. RESULTADOS

<b>4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Estudios de Biofísica Funcional: Caracterización de la variante K107del mediante sistemas de interacción proteína/lípido en modelos biofísicos .....</b>	<b>63</b>
4.2.1. Estudios de pérdida de contenido de liposomas unilamelares inducido por proteínas .....	63
4.2.2. Estudios de interacción de proteínas con monocapas lipídicas .....	66
4.2.3. Entrecruzamiento intramolecular de Wt y K107del en estado monomérico...	69
4.2.4. Estudios de clarificación de liposomas multilamelares de DMPC .....	71
4.2.5. Caracterización por PAGE de complejos lipoproteicos formados por micelización espontanea del DMPC .....	74
4.2.6. Análisis morfológico de partículas lipoproteicas reconstituidas al microscopio electrónico .....	76
4.2.7. Caracterización de complejos lipoproteicos reconstituidos asistidos por detergentes .....	77
4.2.8. Ensayos de interacción proteica con LDL nativas.....	79
4.2.9. Ensayos de unión de proteínas a lipoproteínas en plasma total .....	82
4.2.10. Ensayo de unión de LDL a MOVAS .....	84
<b>4.3. Estudios de biofísica estructural .....</b>	<b>85</b>
4.3.1. Ensayos de oligomerización nativa .....	85
4.3.2. Estudio de oligomerización de Wt y K107del mediante entrecruzamiento con BS <sup>3</sup> .....	86
4.3.3. Cuantificación comparativa de los estados oligoméricos de Wt y K107del entrecruzados mediante FPLC .....	87
4.3.4. Análisis estructural de oligómeros libres de lípidos por fluorescencia intrínseca.....	89
4.3.5. Fluorescencia intrínseca de oligómeros entrecruzados lipidados .....	91

<b>4.4. Determinación de dominios interactuantes de K107del mediante espectrometría de masas</b> .....	93
4.4.1. Aproximación metodológica .....	93
4.4.2. Diseño experimental y puesta a punto .....	95
4.4.3. Análisis de xlinks (péptidos entrecruzados) utilizando SIM-XL .....	97
4.4.4. Determinación de abundancias relativas para los xlinks de alta confianza.....	99
<b>4.5. Estudios proteómicos y biocelulares</b> .....	<b>104</b>
4.5.1. Puesta a punto para la identificación de proteínas de extractos totales de macrófagos humanos THP-1 utilizando tecnología Orbitrap.....	104
4.5.2. Identificación de proteínas totales en extractos provenientes de células tratadas con Wt y K107del .....	105
4.5.3. Análisis comparativo por t-test sobre los niveles de expresión diferenciales de proteínas en células tratadas con Wt y K107del .....	107
4.5.4. Estudio de proteínas “ausentes/presentes” no consideradas en el análisis t-test de dos muestras .....	112
4.5.5. Resumen simplificado de los reportes .....	113
4.5.6. Validación metodológica de los resultados: precisión de la tecnología Orbitrap.....	114
4.5.7. Validación bioquímica de los hallazgos realizados por orbitrap.....	116
4.5.8. Selección de proteínas target para su estudio en el contexto aterosclerótico.....	117
4.5.9. Criterio de selección de inhibidores para el estudio de la dependencia en la sobreexpresión de p62 y la vía Nrf2, a partir del tratamiento con Wt y K107del....	118
4.5.10. Criterio de selección de inhibidores para el estudio de la dependencia en la sobreexpresión de p62 y la vía Nrf2, a partir del tratamiento con Wt y K107del...	121

## **5. DISCUSIÓN**

<b>5.1. Consideración general</b> .....	<b>122</b>
<b>5.2. Influencia de la delección de la lisina 107 en la funcionalidad de apoA-I</b> .....	<b>122</b>
<b>5.3. Influencia de la delección de la lisina 107 en la estructura terciaria</b> .....	<b>126</b>

5.4. Influencia de la delección de la lisina 107 en la función/respuesta celular....129

5.5. Coincidencias y alternancias en respuesta celular a Wt y K107del.....130

5.6. Posible implicancia fisiológica de las proteínas robustas y relevancia del nodo p62, MMP-9, HO-1.....131

5.7. Acumulación de p62 de manera dependiente a la vía Nrf2, a partir del tratamiento con Wt pero no con K107del.....133

## **6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

6.1. Conclusiones parciales.....136

6.2. Conclusión general..... 136

6.3. Perspectivas ..... 137

## **7. BIBLIOGRAFÍA.....139**



# 1. INTRODUCCIÓN

---

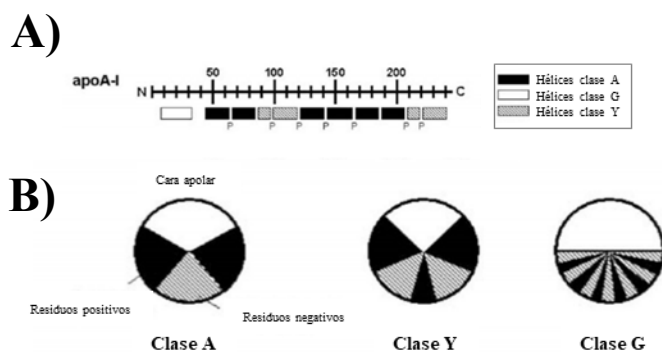
## 1.1. Apolipoproteína A-I: aspectos generales

La apolipoproteína A-I (apoA-I) (del prefijo griego *apo-*: separar, alejar), es la proteína mayoritaria de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), aunque puede encontrarse en menor proporción en quilomicrones (CMs) y en lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL respectivamente) [1][2]. EL cDNA de apoA-I fue obtenido y caracterizado por primera vez en 1982 [3]. La apoA-I madura, una proteína extracelular, tiene una masa aproximada de 28kDa y está conformada por 243 aminoácidos. El gen *APOA1* está localizado en el cromosoma 11 y su secuencia está contenida en cuatro exones que codifican para 267 aminoácidos incluyendo las secuencias pre y propéptido (de 18 y 6 aminoácidos respectivamente). La apoA-I presenta polimorfismos y posee una alta flexibilidad como característica estructural distintiva. Es posible hallarla en plasma en sus diversos estados: libre de lípidos, pobremente lipidada, como lipoproteína discoidal y/o esférica, pudiendo a su vez éstas variar en tamaño [4] y por ende en forma. La capacidad de asociarse con lípidos está ligada a la anfipaticidad de sus  $\alpha$ -hélices, delimitadas generalmente por residuos de prolina. A su vez apoA-I es capaz de autoasociarse en su estado libre de lípidos, aunque no se conoce el propósito funcional de esos estadios. Clásicamente se vincula a esta proteína con el transporte de lípidos especialmente colesterol, aunque se conocen otras funciones moleculares como coactivador enzimático [5], proteína regente estructural de las HDL y de su proteoma [6]; hasta activadora de la movilidad de los espermatozoides [7]. Inclusive comienza a discutirse su posible rol neutralizante en respuesta a agentes patógenos como virus, bacterias y parásitos [8]. Así, en la actualidad puede considerarse a la apoA-I como una proteína multifuncional.

## 1.2. Modelos estructurales vigentes para apoA-I

### 1.2.1. Modelos estructurales de apoA-I libre de lípidos

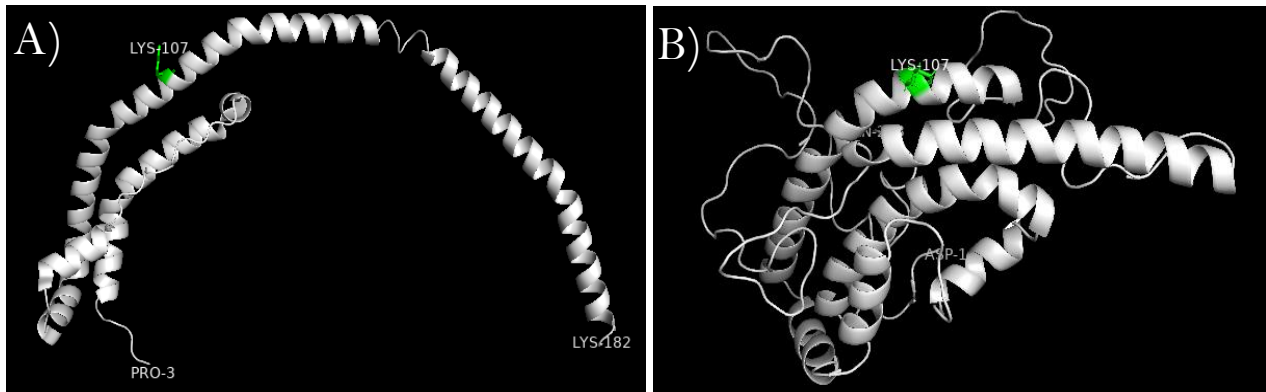
Respecto a la estructura de apoA-I, únicamente el nivel estructural primario se encuentra libre de controversias. Clásicamente se describió a la apoA-I como una proteína compuesta por  $\alpha$ -hélices anfipáticas conformadas por 11 o 22 aminoácidos, interrumpidas por prolinas. Las hélices presentan una distribución polar coincidente con las típicas clases A, Y y G (de 11-mer ó 22-mer); [9] como se representa en la figura 1.1. En este trabajo de tesis se abordarán mayormente los modelos de estructura terciaria de apoA-I.



**Figura 1.1. Distribución de las clases de  $\alpha$ -hélices de apoA-I.** La figura A) muestra la distribución de  $\alpha$ -hélices interrumpidas por prolinas para la apoA-I madura. La imagen B) representa las clases de hélices según la distribución de los residuos aminoacídicos. Tomada y modificada de Lund-Katz *et al.* 2010 ([https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_7))

Así, la estructura terciaria de apoA-I se estudiará en su estado libre de lípidos o en su estado lipidado como HDL discoidales (dHDL). Para el primer caso se utilizarán los 2 modelos estructurales más recientes por difracción de rayos X y un modelo consenso. Cabe mencionar que la principal dificultad para la construcción de un modelo definitivo que explique la estructura de la apoA-I, viene dada porque no pudo ser cristalizada completa, hasta el momento. Así, los estudios de difracción de rayos X se realizan a partir de fragmentos de apoA-I, pudiendo generarse entonces modelos parciales de la proteína. El modelo mostrado en la figura 1.2.A) 3R2P de Mei y Atkinson 2011, se obtuvo a partir de dímeros antiparalelos del extremo C-terminal de la proteína truncada: apoA-I $\Delta(185-243)$  con una definición de 2,2 Å (<https://www.rcsb.org/structure/3R2P>). El otro modelo utilizado en esta tesis consta del “modelo consensuado” (o consenso) de apoA-I monomérica y libre de lípidos, generado por Melchior *et al.* en 2017 [10] y mostrado en la figura 1.2.B) (<https://homepages.uc.edu/~davidswm/structures.html>). Para este modelo se utilizaron los datos provenientes de diversas técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), entrecruzamiento con diferentes agentes

químicos (crosslinking), espectrometría de masas (MS), y de modelado molecular; que fueron obtenidos por diferentes grupos de reconocida trayectoria en el estudio de la estructura de esta proteína.

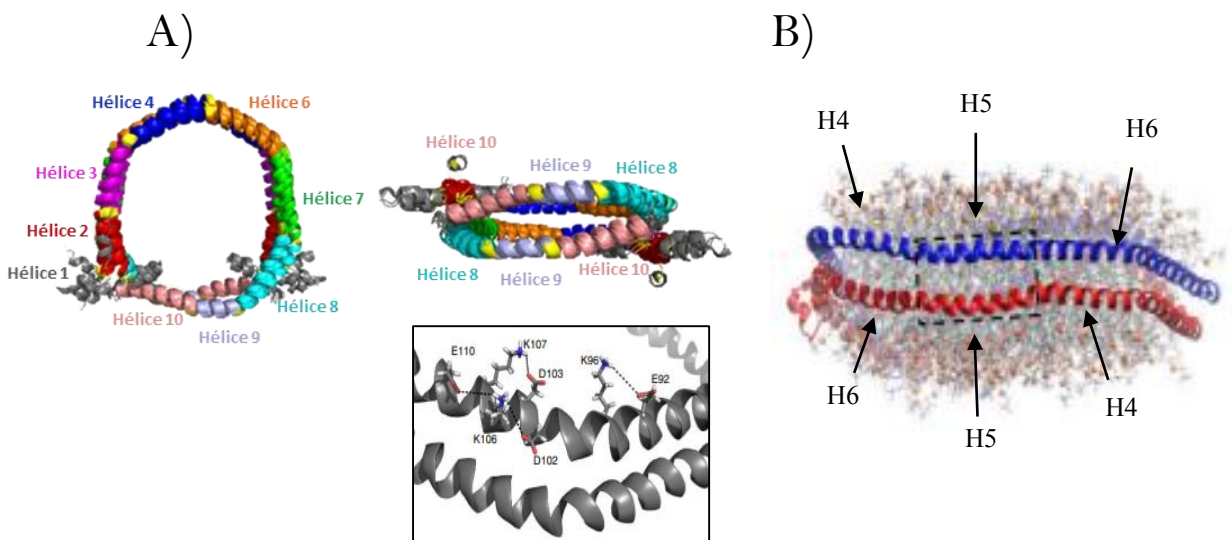


**Figura 1.2. Modelos por difracción de rayos X y consensuada de apoA-I monomérica y libre de lípidos.** La figura muestra los modelos de apoA-I generados por **A)** cristalografía de rayos X por Mei y Atkinson 2011 apoA-I<sup>Δ(185–243)</sup> (<http://www.rcsb.org/structure/3R2P>) y **B)** el modelo consensuado reportado por Melchior *et al.* 2017 (<https://homepages.uc.edu/~davidswm/structures.html>). En la figura se etiquetaron los extremos N-ter y C-ter para cada modelo y se resalta la lisina 107 (K107) en verde. Las imágenes se generaron utilizando <https://pymol.org/2/>.

### 1.2.2. Modelos estructurales de apoA-I lipidada

Debe aclararse que en este apartado se hará mención únicamente a la estructura de apoA-I formando parte de los complejos discoidales descritos de 140kDa (diámetro de 10,6 Å) compuestos por dos hemicapas de 160 fosfolípidos rodeados por las apoA-I en el centro. Este modelo clásico denominado como “doble cinturón” o “estructura de anillo” de dos apoA-I rodeando una bicapa lipídica fue propuesto por primera vez por Segerst en 1999 [11] y si bien pueden presentarse nuevas construcciones más precisas, la idea general de “cinturón” se mantiene. En una versión más detallada y con mayor definición, las dHDL pueden visualizarse en la estructura de Bibow *et al.* 2017 [12] y Pourmoussa *et al.* 2018 [13]. Si bien a los fines prácticos de esta tesis se contemplaran estas estructuras discoidales, estudios recientes vinculan el tamaño y forma de las HDL a su función [14].

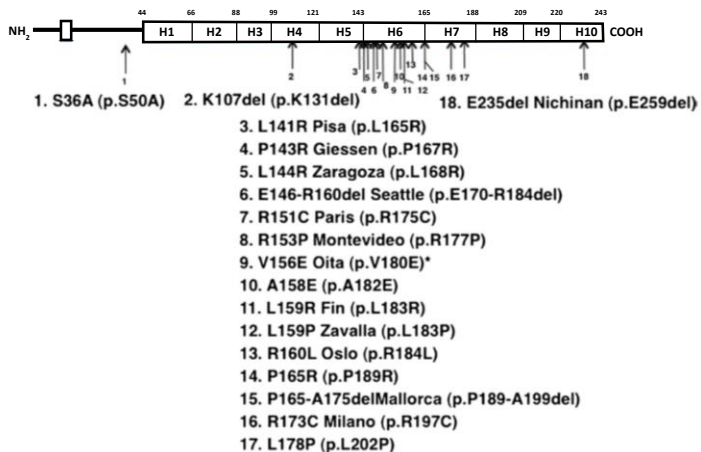
La yuxtaposición que pueden adoptar las hélices de las dos apoA-I que conforman la región ecuatorial de las HDL discoidales reconstituidas o recombinantes (rHDL), se denomina “registro helicoidal” graficado en la figura 1.3. Así, por ejemplo, las dHDL pueden adoptar dos o tres registros fisiológicos (al menos observados) más allá de la cantidad de rotaciones teóricas posibles. Los registros LL5/5 [11] y LL5/2 [15] son actualmente los más aceptados con prevalencia plasmática; aunque el registro LL5/4 fue recientemente sugerido como minoritario, pero también presente en plasma [16]. La relevancia de los registros helicoidales se supone en base a su rol diferencial en la regulación de diferentes enzimas, la formación y estabilidad de los complejos y las propiedades funcionales de las HDL humanas [17][18].



**Figura 1.3. Disposición de tipo “doble cinturón” antiparalelo de un par de apoA-I formando las rHDL.** La figura A) extrahida y modificada de Bibow *et al.* 2017 (<https://doi.org/10.1038/nsmb.3345>); muestra la disposición las hélices de apoA-I antiparalela envolviendo los lípidos (no mostrados). El recuadro muestra la red salina intracatenaria formada por K107 en la disposición proteica graficada arriba. La imagen B) extraída y modificada de Pourmousa *et al.* 2018 (<https://doi.org/10.1073/pnas.1721181115>) muestra las rHDL formadas luego de 10 $\mu$ s de simulación, usando una relación 200:20:2 POPC:colesterol:apoA-I; el recuadro señala el registro LL5/5.

### 1.3. Variantes naturales de apoA-I con relevancia clínica

Diversas patologías se vinculan con fallas asociadas a la apoA-I. Las alteraciones de apoA-I pueden relacionarse con pérdida de función y en algunos casos generar efectos benéficos en sus portadores. Contextualizando históricamente estos hallazgos, en el año 1980 Franceschini *et al.* describen por primera vez una mutante natural de apoA-I en Milán (Italia): la apoA-I<sup>Milano</sup>; asociada con efectos beneficiosos para sus portadores [19]. Originalmente las variantes de apoA-I recibían el nombre del lugar donde eran descubiertas. Desde entonces hasta hoy siguen describiéndose nuevas variantes naturales de apoA-I silenciosas o con efectos fisiológicos de leves a patológicos. Se conocen alrededor de 50 mutaciones naturales para apoA-I, algunas variantes naturales que acarrear manifestaciones clínicas pueden clasificarse según la locación del o los residuos afectados (aunque no de manera absoluta), por ejemplo: mutaciones entre los residuos 1-100 son asociadas con la propensión amiloidogénica, mutaciones en la región central (residuos 140-170) con defectos en la activación de la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), mientras que solo un número de mutaciones menor en la región 180-243 no presentan un efecto común. En la imagen 1.4. se pueden observar algunas mutaciones con pérdida de sentido típicamente vinculadas a niveles bajos de C-HDL.



**Figura 1.4. Mutaciones de apoA-I con pérdida de sentido asociadas a niveles bajos de C-HDL.** El esquema recopila algunas mutaciones de apoA-I clásicamente asociada a niveles bajos de colesterol HDL (C-HDL) en el plasma de los portadores de dichas variantes. La figura fue extrahida y modificada de *HDL handbook*, segunda edición.

## 1.4. Variante natural de apoA-I de delección de la lisina 107: ApoA-I<sup>K107del</sup>

En el año 1982, Uterman *et al.* describen por primera vez a la apoA-I<sup>Marburg</sup>, esta variante resultaba en una carga relativa de -1 al evaluarla por isoelectroenfoque, comparada con la apoA-I salvaje. Posteriormente Menzel *et al.* en 1984 denominaron a esta proteína mutante como “apoA-I-Münster-2” (ó apoA-I Munster-2 ó apoA-I<sup>Munster</sup>). En el mismo año Rall *et al.* describieron por primera vez que la variación que generaba la carga -1 de la apoA-I era consecuencia de la delección de una única lisina en la posición 107 (partiendo de la secuencia madura de 243 aminoácidos). Luego de la determinación de la delección de lisina, esta variante se siguió reportando con diversos nombres: apoA-I<sup>Helsinki</sup>; apoA-I Lys107→0 (ó apoA-I K107-0); apoA-I<sup>K107del</sup> (ó apoA-I deltaK107, ó apoA-I ΔK107) y actualmente se la designó apoA-I<sup>K131del</sup> por Ljunggren *et al.* en 2014 acorde a su secuencia completa considerando los fragmentos pre y propéptido. Con una incidencia de 1/5000 la mutante apoA-I<sup>K107del</sup>, es la más frecuente en Alemania [20] y existe una serie de reportes contradictorios sobre los efectos clínicos vinculados a la portación de esta variante. Típicamente se la considera como una mutación proamiloidogénica, inductora de aterosclerosis severa y temprana, y se la vinculó a hipertigliceridemias. Aunque también se asoció a esta variante con la pérdida de función para la activación de algunas enzimas como LCAT [21], estudios más recientes contradicen esos resultados. A su vez este laboratorio ha reportado previamente que esta variante podría presentar una respuesta celular alterada, hipótesis sobre la que se profundizará en la sección 4.5. “Estudios Proteómicos y Celulares”, en base al hallazgo del aumento de niveles de expresión de algunas proteínas. Sin embargo no se ha reportado hasta hoy un vínculo directo y unívoco entre alguna de las patologías antes mencionadas y la portación de la apoA-I<sup>K107del</sup>. En el cuadro 1.1. se resumen los efectos clínicos asociados a esta variante y los reportes de estudios *in vitro* sobre la misma.

**Cuadro 1.1. Reportes bibliográficos de los efectos clínicos observados en portadores de apoA-I<sup>K107del</sup> comparativamente al fenotipo salvaje.**

Parámetro clínico	ApoA-I <sup>K107del</sup>	¿Reportes contradictorios?	Referencia	Comentarios
Colesterol sérico	=	Si	[22] [23]	
TG	=/↑	Si	[22] [23] [20]*	*Solo en hombres
C-LDL	=	Si	[22] [23]	
C-HDL	↓	Si	[22] [23] [24]	

<i>LDL</i>	=	Si	[22] [23]	
<i>HDL</i>	↓	Si	[22] [23] [20]* [25]**	* Solo en hombres; **Post Prandial
<i>HDL2</i>	Ausente/↑	Si	[22] [23] [25]*	*Post Prandial
<i>HDL3</i>	↓	Si	[22] [23] [25]*	*Post Prandial
<i>Otras subfracciones de HDL (2;3)</i>	↓	No	[22] [23]	
<i>Lp(A-I)</i>	=	No	[24]	
<i>Lp(A-I/A-II)</i>	↓	Si	[24]	
<b>Tiempo de residencia de:</b>				
<i>A-I en Lp(A-I)</i>	↓	No	[24]	
<i>A-I en Lp(A-I w A-I)</i>	↓	No	[24]	
<i>A-II en Lp(A-I w A-I)</i>	↓	No	[24]	
<b>Niveles de apolipoproteín a</b>				
<i>A-1</i>	↓	Si	[22] [23] [25]	
<i>A-2</i>	↓	Si	[22] [23] [25]	
<i>B</i>	=	No	[22] [23]	
<i>C-I</i>	=	Si	[22] [23]	
<i>C-II</i>	=	Si	[22] [23]	
<i>E</i>	=/↑	Si	[22] [23]	
<b>Composición proteica de HDL</b>	modificada		[26]	
<b>Act. enzimática</b>				
<i>LCAT</i>	=/↓	Si	[22] [23] [21]	
<i>CETP</i>	↓	No	[22] [23]	

Basándose en los análisis biofísicos sobre la K107del (la variante recombinante de apoA-I<sup>K107del</sup>) resumidos en el cuadro 1.2., mucho se ha hipotetizado acerca del rol y relevancia de la lisina 107 para la apoA-I. El factor determinante para este residuo parece subdividirse en dos posibilidades no excluyentes entre sí: 1) el cambio conformacional a nivel secundario a consecuencia de la disrupción en el registro  $\alpha$  helicoidal causado por la ausencia de un aminoácido; y 2) la ausencia del grupo -NH<sub>2</sub> en la posición 107, que formaría parte de una red cristalina clave en la estabilización de la apoA-I monomérica libre de lípidos, tanto como en la estabilización de las hélices contiguas en las dHDL según su registro LL5/5 o LL4/5.

**Cuadro 1.2. Reportes bibliográficos de técnicas biofísicas e *in vitro* para la variante K107del comparativamente a la apoA-I salvaje.**

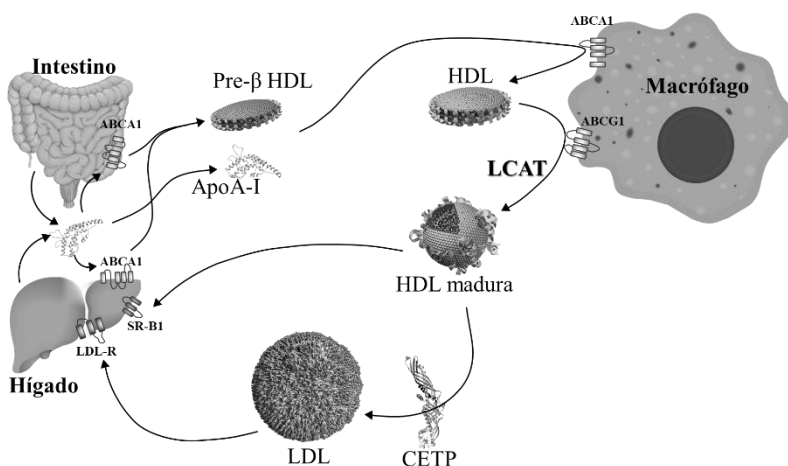
<i>Ensayo biofísico</i>	K107del	Reportes contradictorios	Referencias	Comentarios
<i>Carga (isoelectroenfoque)</i>	-1		[22]	
<i>Alfa-helicidad</i>	=	No	[27] [28]*	*ensayado con pro-Wt y pro-K107del
<i>Alfa-helicidad en la HDL</i>	menor	Si	[28]* [29]	*ensayado con pro-Wt y pro-K107del
<i>Clarificación del DMPC</i>	↓*/↑	Si	[27] [28]*	*ensayado con pro-Wt y pro-K107del
<i>Unión a partículas ricas en TG</i>	↑		[27]	
<i>Tamaño de rHDL (DMPC)</i>	↓/↑	Si	[30] [28]*	*ensayado con pro-Wt y pro-K107del
<i>Fluorescencia intrínseca</i>	Alterado (corrimiento al rojo)	No	[30] [31]	
<i>Desnaturalización con Gnd</i>	Más flexible	No	[27]	
<i>Tendencia a agregarse</i>	↑	Si	[31]	
<b><i>In vitro</i></b>				
<i>Eflujo de colesterol (proteína libre de lípidos)</i>	=	No	[28]* [32]	*ensayado con pro-Wt y pro-K107del
<i>Eflujo de colesterol (rHDL)</i>	=	No	[28]*	*ensayado con pro-Wt y pro-K107del
<i>Resistente a reordenamientos con LDL</i>	Más resistente		[30]	
<i>Activación de LCAT</i>	↓	Si	[30]	
<i>Nivel de ACAT-1 (SOAT1)</i>	↑	Si	[32]	

## 1.5. Fisiología y relevancia metabólica de la apoA-I

ApoA-I es una proteína secretada que se sintetiza principalmente en el hígado, aunque se pueden observar niveles de expresión mucho menores en testículos y diferentes regiones del tracto digestivo como intestino delgado, duodeno y colon; la misma se halla mayoritariamente en plasma. La función más relevante que se ha descrito hasta la actualidad para esta proteína es su rol en el transporte reverso del colesterol (TRC). Este proceso implica la captación de colesterol por parte de la apoA-I (en su forma libre de lípidos o pobremente lipidada) desde los tejidos extrahepáticos para su transporte por plasma al hígado (figura 1.5.) y tejidos esteroideogénicos. Una vez en el hígado los destinos posibles del colesterol son: procesarse a sales biliares que serán excretadas, o bien volver a exportarse en las LDL (en un ciclo sin sentido desde esta perspectiva). En tejidos esteroideogénicos como suprarrenales se utilizará para la síntesis de hormonas



esteroides (esteroidogénesis). La vía metabólica del TRC, sugerida por primera vez en 1968 [5], permitió vincular a los niveles altos de HDL o C-HDL con un efecto benéfico por su rol ateroprotectivo. Esta explicación clásica, fue complejizándose con los años a medida que se descubrieron nuevas ramificaciones en la vía del TRC, que pueden generar ciclos y modifican la unidireccionalidad supuesta anteriormente. Hoy se sabe que enzimas como la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) tienen un rol clave en la dirección del flujo del colesterol ya que transfiere ésteres de colesterol (CE) de las HDL a las LDL, truncando así ocasionalmente el proceso del RCT, con un claro efecto proaterogénico. En el mismo sentido el uso de los niveles plasmáticos de HDL y LDL como único indicador de riesgo aterogénico midiendo la tasa LDL/HDL, entró en revisión hace alrededor de 10 años. En la actualidad la “calidad” de las HDL es considerada como un factor determinante en el efecto ateroprotector, así como también la capacidad del transporte efectivo de los CE al hígado (evitando desvíos como en el caso de la CETP) [33][34]. De todas formas, hoy en día no se encuentran estandarizados los análisis bioquímicos que servirían para evaluar estos aspectos en pacientes y la tasa LDL/HDL sigue utilizándose como índice de aterogenicidad.



**Figura 1.5. Esquematización del transporte reverso del colesterol .** Las flechas indican el recorrido vectorial de las lipoproteínas indicadas. Los eventos claves para el RCT son la captación del colesterol intracelular por las HDL pobremente lipidadas o pre-β; y su posterior esterificación por la LCAT para formar parte de las HDL maduras. La CETP inhibe el transporte reverso del colesterol transfiriendo los ésteres de colesterol desde las HDL a las LDL. Sobre los órganos se indican algunos de los receptores celulares involucrados en el RCT.

Para dimensionar la complejidad de las HDL: se sabe que las mismas pueden contener hasta 219 proteínas accesorias (<https://homepages.uc.edu/~davidswm/HDLproteome.html>) -al día de hoy-, vinculadas no sólo al transporte de lípidos sino también a la homeostasis, a la regulación enzimática y a la respuesta inmune [6][35]. También se demostró ampliamente que las HDL transportan diferentes micro-RNAs (miRNA) con efectos funcionales -al menos sobre células- [36][37]. Tanto el gran número de subespecies de HDL, las moléculas que son capaces de transportar (hormonas, vitaminas, lípidos, nucleótidos, etc.), como la creciente complejidad de su proteoma, sugieren que estas lipoproteínas han de cumplir funciones aun no establecidas y que posiblemente el transporte de lípidos sea sólo una de ellas.

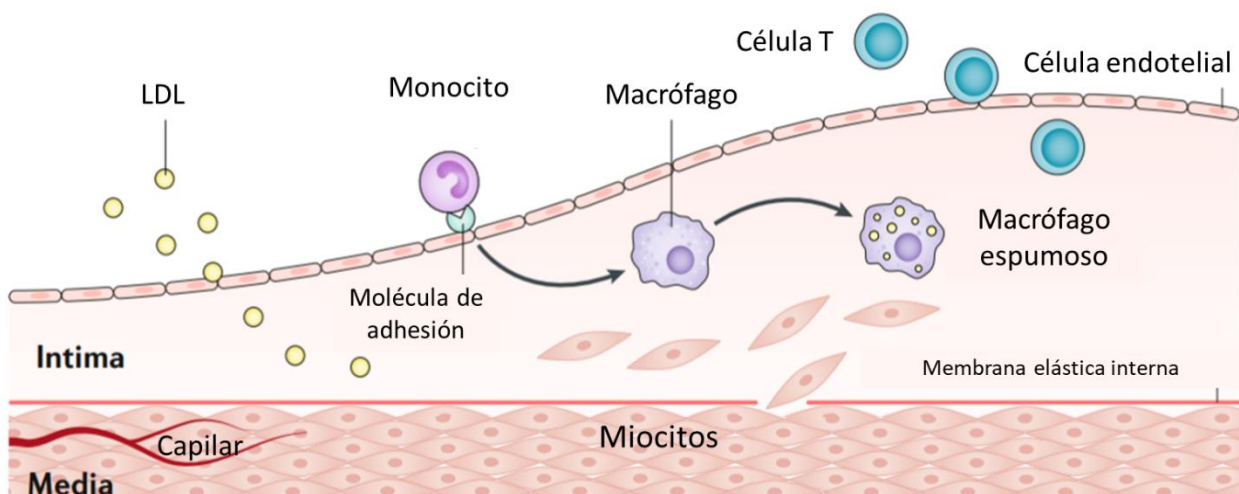
## **1.6. Relevancia fisiológica de apoA-I en seres humanos**

### **1.6.1. Enfermedad cardiovascular y apoA-I**

Las enfermedades cardiovasculares generan el 29% de las muertes en Argentina, posicionándose como la principal causa de muerte por enfermedades no transmisibles; que junto con diabetes y tumores concentraron el 50% de todas las muertes registradas en 2017 (Instituto Nacional de Estadísticas: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>).

Concordantemente, las CVD son consideradas como la principal causa de muerte por ENT en todo el mundo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ([https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1)) provocando el deceso a 17,9 millones de personas todos los años (el 31% de todas las muertes a nivel mundial). Aunque las CVD pueden manifestarse en diferentes regiones del sistema circulatorio, mayoritariamente desencadenan la enfermedad aterosclerótica en las arterias coronarias [38]. La aterosclerosis (del griego *athera*: comida triturada, una especie de papilla en forma de masa y *scleros*: duro) consta de la acumulación de material graso y/o fibroso en la túnica íntima de las arterias (monocapa celular que

recubre la cara interna de éstas). El desarrollo aterosclerótico se desencadena a partir de la captación desregulada de colesterol-LDL por parte de los macrófagos, que terminan modificando su morfología a células espumosas o *foam cells*, hasta que eventualmente mueren, dando origen a la placa ateromatosa. El evento aterosclerótico resumido en la figura 1.6. es un proceso complejo, que requiere la infiltración de monocitos circulantes a las paredes arteriales puntualmente a la túnica íntima, propiciado a su vez por un entorno proinflamatorio. Los monocitos se transforman en macrófagos al endocitar las LDL modificadas, principalmente oxidadas (oxLDL), iniciando el proceso de formación de las células espumosas y acentuando aún más el contexto inflamatorio. La sucesiva acumulación de material ateromatoso termina por obstruir la luz arterial, y/o desprender fragmentos necrosados, que ocasionarán diversas trombosis. Como se mencionó anteriormente, apoA-I es una proteína clave en la prevención de la formación de la placa ateromatosa, gracias su rol en el TRC. Por ejemplo, algunas variantes naturales de apoA-I se vinculan a dislipemias que aumentan el riesgo aterogénico y a su vez la pérdida de función de esta proteína también se asocia con elevación del riesgo aterogénico [39]. Sin embargo, se sabe que apoA-I, puede acumularse en la placa, por lo que esta proteína ha de perder su capacidad ateroprotectiva como consecuencia del entorno patológico.



**Figura 1.6. Iniciación y progresión del evento aterosclerótico: enfoque celular.** En el gráfico se esquematiza resumidamente el proceso de infiltración y diferenciación de los monocitos a macrófagos y luego a células espumosas, mediado por captación las LDL por parte de los macrófagos. Tomado y modificado de Libby *et al.* 2019 (<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>),

### **1.6.2. Amiloidosis y apoA-I**

La amiloidosis es una patología del grupo de las ENT que resulta del depósito de proteínas mal plegadas (o que presentan un plegamiento anómalo) típicamente con estructura de hoja plegada  $\beta$ ; en forma de material fibrilar amorfo en diversos tejidos y cuya manifestación clínica más frecuente es la afectación cardíaca, renal y hepática [40]. Existen alrededor de 20 proteínas con capacidad para generar depósitos amiloides, siendo la apoA-I una de ellas. En este sentido, apoA-I<sup>K107del</sup> es una de las variantes amiloidogénicas, llegándose a encontrar agregada en la placa ateromatosa presente en la íntima de aortas ateroscleróticas [41]. El motivo que explica la propensión a la amiloidosis de las proteínas no es completamente conocido en nuestros días, sin embargo, es evidente que un evento determinado desencadena esta capacidad potencial como un hecho. Para el caso puntual de la apoA-I, ello se vincula a modificaciones post traduccionales (PTM) como oxidaciones, o bien alteraciones en su estructura primaria, como mutaciones. Por ejemplo, el entorno oxidativo es común tanto para esta patología como para la aterosclerosis y se piensa que la apoA-I puede ser modificada en este entorno. Finalmente, y como consecuencia de la acumulación de los cuerpos fibrilares, los tejidos afectados terminan dañándose lo que genera la manifestación de la patología en el paciente. Lamentablemente no existen tratamientos que permitan erradicar esta enfermedad potencialmente mortal, sin embargo, la detección temprana puede mejorar y extender la calidad de vida del paciente.

### **1.6.3. Inflamación y apoA-I**

La inflamación (del latín *in-*, *flamma*, *-tio*: “algo que está en llamas”, en este caso un órgano o tejido), es un proceso de respuesta inmunológica a injurias, o agentes exógenos de naturaleza biológica, química o física; que normalmente cumple un rol reparador. Sin embargo, se considera una situación patológica cuando la inflamación deviene en un proceso crónico propiciado por diversas enfermedades, desde artritis o cáncer, hasta aterosclerosis.

Seguido al RCT, el rol antiinflamatorio de las HDL es ampliamente reconocido como una función preponderante [42]; tal es así que se la considera su segunda función fisiológica más importante. Por ejemplo, se sabe que las HDL son capaces de inhibir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales inducidas por citoquinas [43]. Y en conejos infundidos con rHDL se redujo la inflamación vascular por la inhibición de estas moléculas de adhesión [44]. Diferentes citoquinas fueron asociadas al proceso inflamatorio (y formación del inflamasoma), entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquinas 6 y 1 $\beta$  (IL-6; IL-1 $\beta$ , respectivamente), entre muchas otras. Por ejemplo, la acumulación de colesterol en la placa aterosclerótica puede derivar en la formación de cristales de colesterol. Ya sea que los mismos macrófagos formen estos cristales o bien que los endociten, la presencia de cristales de colesterol deriva en la activación del inflamasoma, y subsiguiente liberación citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  [45].

Una de las hipótesis que vinculan a la apoA-I con su rol antiinflamatorio, supone que apoA-I es capaz de inhibir la liberación de algunas de las citoquinas proinflamatorias, reduciendo así el reclutamiento de monocitos en la túnica íntima [46]. Sin embargo, en un contexto patológico, como la inflamación crónica, se sabe que tanto la apoA-I como diversos componentes de las HDL (lípidos, y otras proteínas accesorias) pueden sufrir diversas modificaciones, como oxidación, glicación, etc. Como consecuencia de estas modificaciones, se piensa que las HDL pueden perder su función antiinflamatoria pudiéndose volver inclusive proinflamatorias. Lo mismo ocurre con la apoA-I: al sufrir diversas PTMs debidas a un entorno patológico, la proteína modificada puede sufrir la pérdida de su función hasta volverse proinflamatoria [47].

#### **1.6.4. COVID-19 y apoA-I**

Como se mencionó, las HDL parecen desenvolver algún rol inmunológico que aún no está establecido con claridad. Aunque existen algunos estudios en proceso de publicación (disponibles como *preprints*), esta introducción aborda el tema exclusivamente sobre resultados que fueron revisados por pares. En este contexto

estudios recientes vinculan la posibilidad de daño hepático debida a la infección por SARS-CoV-2, con dislipemia y estrés oxidativo [48]. A partir de un estudio en 263 pacientes positivos para COVID-19 (diagnosticados vía reacción en cadena de la polimerasa, PCR), se pudo constatar la presencia de niveles plasmáticos elevados de triglicéridos (TG) en lipoproteínas, junto con una baja en los niveles de colesterol asociado a lipoproteínas (LDL y HDL). En conjunto con estos hallazgos, los niveles de apoA-I y apoA-II también disminuyeron notablemente en pacientes COVID-19, pero sin modificar la proporción apoA-I/apoA-II en las HDL, sugiriendo una baja en su concentración plasmática. En su totalidad, las lipoproteínas con potencial aterogénico aumentaron en un factor de 2 a 1 en estos pacientes. Basado en los resultados, se considera que la infección por COVID-19 acarrea consecuentemente, una elevación en el riesgo cardiovascular [49]. Este hecho no se había considerado como un parámetro relevante previamente a la realización de estos estudios [48].

## **1.7. Implicancia estructural en la función fisiológica de apoA-I**

La concentración plasmática de apoA-I es de alrededor de 1,3 mg/ml, incluyendo todos sus estados posibles de lipidación. Aproximadamente el 5 al 10% de la apoA-I circula en su estado libre de lípidos o pobremente lipidadada [50] mientras que la restante en forma de HDL de alguna clase. Se considera que los estados libres de lípidos, pobremente lipidadada y dHDL (conocidas también como “pre- $\beta$  HDL”, por su perfil de movilidad electroforética) tienen la capacidad de promover el eflujo de colesterol desde los depósitos intracelulares secuencialmente vía el transportador tipo cassette ATP-dependiente A1 (ABCA1). El ABCA1 se encarga de transportar principalmente fosfolípidos y colesterol, pero la acción del transportador tipo cassette de la misma familia denominado G1 (ABCG1) incrementa la transferencia de colesterol intracelular hacia la HDL naciente. Además de la transferencia neta del colesterol, la biogénesis de las HDL completa requiere del proceso de “rellenado” del núcleo hidrofóbico de las mismas o *maduración* a cargo de la LCAT, actuando la apoA-I como cofactor y

activador de la misma. Esta enzima se encuentra formando parte de las HDL en su superficie, y es fundamental en el TRC ya que cataboliza la formación de ésteres de colesterol que se transportan vía las HDL. Sin la existencia de la LCAT las HDL solo podrían transportar un bajo número de moléculas de colesterol que deberían intercalarse en cada hemicapa fosfolipídica.

## **1.8. Aspecto metabólico de apoA-I**

### **1.8.1. ApoA-I en el contexto celular**

Como se mencionó apoA-I presenta un rol metabólico multifacético. En las primeras etapas del TRC es el aceptor plasmático de fosfolípidos y colesterol vía ABCA1. Mediante estudios de entrecruzamiento químico y criomicroscopía electrónica (cryo-EM) diversos grupos demostraron la interacción entre la apoA-I y los dominios extra celulares (ECD) 1 y 2 del ABCA1 [51][52][53][54]. También es sabido que a partir de esta interacción los niveles celulares de ABCA1 aumentan significativamente. Sin embargo, los mecanismos concretos que posibilitan la movilización de los depósitos intracelulares de colesterol hacia las HDL son desconocidos. A su vez se propuso como alternativa para la biogénesis de las HDL la internalización de apoA-I por parte de la célula vía endocítica, donde la lipidación mediante ABCA1 se produce en vesículas endoplasmáticas que luego exocitan las HDL ya formadas. Este proceso denominado como vía de la “retroendocitosis”; pareciera proveer una proporción minoritaria de lipoproteínas, ya que se estima que un máximo del 5% de las HDL circulantes podrían haberse formado por este mecanismo [55].

En cualquier caso, resulta evidente que la interacción de la apoA-I con ABCA1 es un evento clave para el proceso del TRC. No solo por estimular al transportador, sino también porque esta interacción gatilla diversos sistemas de transducción de señales, entre las que se encuentran la vía de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC) y el sistema Janus quinasa 2 (JAK2), entre otros [56]. Bajo estas consideraciones, resulta trascendente el estudio de las vías involucradas en los pasos obligados para el TRC, ya sean conocidas o las que resten por

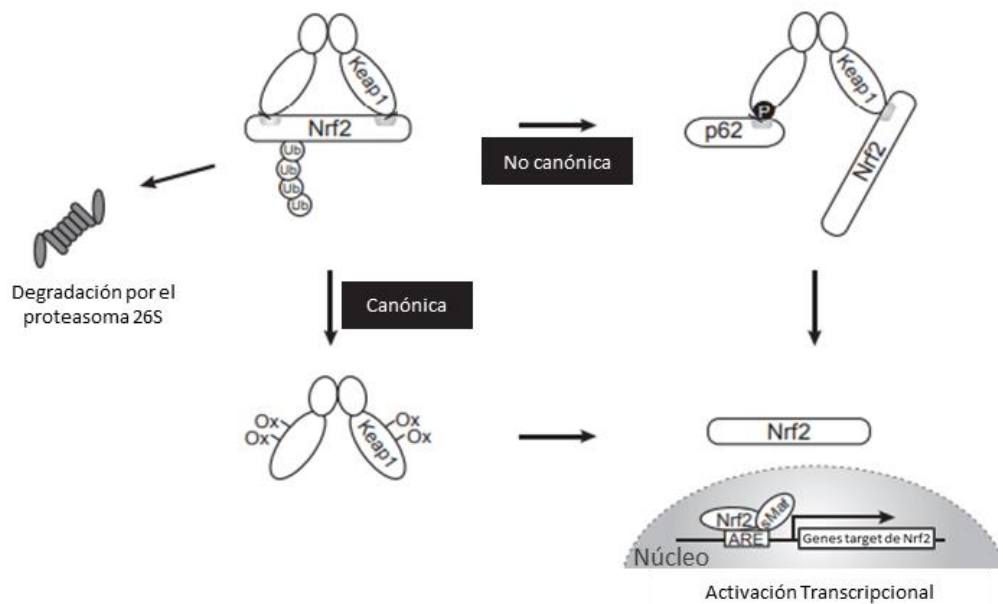
descubrir. Por ejemplo, en esta tesis se describe la posible acumulación de la proteína multifuncional p62 o sequestosoma-1 (SQSTM1) de manera dependiente a la vía del factor eritroide nuclear 2 (Nrf2), a partir del tratamiento celular con apoA-I.

### **1.8.2. Vía antioxidante Nrf2 -Keap1**

Nrf2-Keap1 (en inglés: *nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2 y Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology [ECH]-associated protein 1*) es una de las vías más importantes en la defensa celular ante una variedad de tóxicos y carcinógenos, mediante el incremento en la expresión de genes con efecto protector. En la figura 1.7. se muestra la respuesta antioxidante generada a partir de la activación de esta vía. Básicamente Nrf2 es un factor nuclear presente en citoplasma, asociado con la proteína Keap1 mediante dominios específicos. Esta asociación genera la constante degradación proteasomal de Nrf2 y la imposibilidad de ser translocado a núcleo. Ante algún evento desencadenante (como ser una desregulación redox a nivel celular) Keap1 sufre oxidaciones en algunas de sus cisteínas lo que genera un cambio conformacional y termina disociándolo de Nrf2. Cuando Nrf2 está libre, puede translocarse al núcleo e interactuar con los elementos de respuesta antioxidante (ARE). Esta interacción regula el aumento de la expresión de diversos genes, por ejemplo: el de la hemo oxigenasa-1 (HO-1), p62 y algunos citocromos p450, entre otras proteínas vinculadas a respuestas inflamatorias, estrés, transporte y metabolismo de drogas, etc. [57]. Esta activación *canónica* de la vía genera entonces el aumento de los niveles de proteínas celulares con efecto protector. A su vez, la vía Nrf2 puede activarse de manera *no canónica*. Se sabe que p62 es capaz de interactuar con Keap1, lo que evita la degradación proteasomal de Nrf2. En general los niveles basales celulares de p62 no acarrearán efectos sobre esta vía; sin embargo, si los niveles de p62 aumentan, esta proteína interactúa con Keap1, de manera que Nrf2 puede ahora translocar al núcleo y



unirse a los ARE. Como se mencionó p62 es uno de los genes regulados por Nrf2. Esta retroalimentación se denomina también *loop* positivo.



**Figura 1.7. Esquemática de la activación canónica y no canónica de la vía Nrf2-Keap1.**

El esquema muestra la separación de la proteína secuestradora Keap1 a partir de oxidaciones sufridas debido a un eventual desbalance redox en la célula, esta activación canónica permite la traslocación de Nrf2 al núcleo, activando la expresión de genes regulados por los ARE. En cambio, la activación no canónica de la vía se produce por el aumento en los niveles de p62 que se unen a Keap1 liberando a Nrf2, que puede ingresar al núcleo. Mientras que la interacción de Nrf2 con Keap1 deriva en su degradación proteasomal.

Existen diversos activadores e inhibidores conocidos para la vía Nrf2-Keap1. El principal interés en la regulación exógena de esta vía viene dado por su rol en las células malignas. Por su capacidad como protector para las células, lamentablemente también puede proteger las células cancerosas facilitando su progresión. Tal es así que Nrf2 se acumula de manera aberrante en algunos tipos de cáncer, confiriéndoles resistencia a las drogas quimioterapéuticas [58]. Algunos inductores de Nrf2 son básicamente sustancias que generan un entorno oxidante en las células, como el trióxido de arsénico (ATO) [59] que en altas dosis se utiliza como quimioterapéutico para algunos tipos de leucemias, ya que es capaz de inducir la apoptosis selectiva. Por su parte los inhibidores de Nrf2, pueden actuar a diferentes niveles, impidiendo por ejemplo su translocación al núcleo como el ácido retinoico (*all-trans retinoic acid* ATRA), o el ácido ascórbico (AA), favoreciendo la degradación de su mRNA como la luteolina (Lut), o el resveratrol

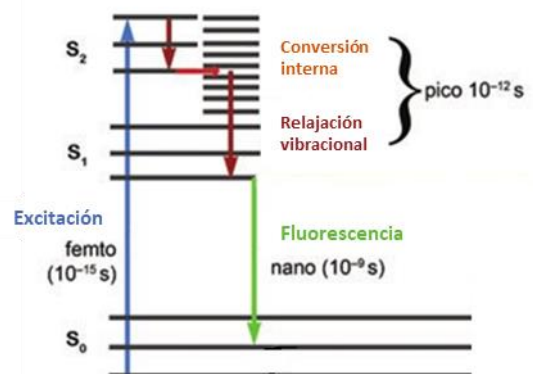
(RSV) que impide la disociación de Nrf2-Keap1 gracias a sus propiedades antioxidantes [60][61][62]. Desde la perspectiva terapéutica, es interesante mencionar que la sinergia generada por el ATO y el ATRA se utiliza como tratamiento para algunos tipos de cánceres.

## 1.9. Fundamentos básicos de métodos y tecnologías específicas utilizadas

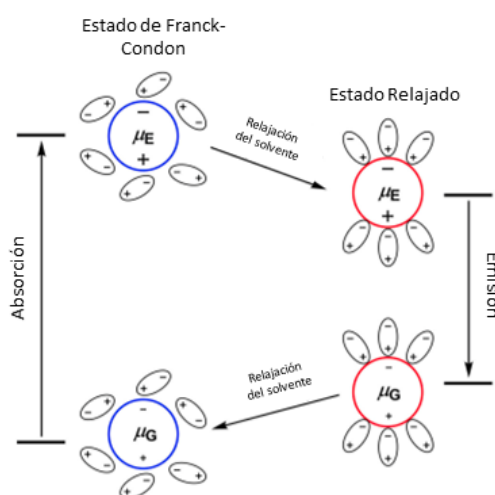
### 1.9.1. Estrategias de estudio asociadas a la fluorescencia

Como es ampliamente conocido, la fluorescencia es la emisión de luz (fotones) que se produce cuando un electrón en singulete que es excitado, retorna a su nivel basal. Típicamente representado en el diagrama de Jablowsky (figura 1.8.), los estados de excitación denominados como  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ; pueden sufrir también efectos de interconversión cuánticos, sin embargo, para el fenómeno de fluorescencia típicamente de  $10^{-8}$  segundos, no llegan a ser registrados. Reportado por Teale y Weber en 1956, los registros de fluorescencia emitida por aminoácidos aromáticos pueden aportar información conformacional de las proteínas. Mas allá que tanto la fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden fluorescer, el rendimiento cuántico del triptófano es ampliamente mayor al de los otros dos aminoácidos. Por este motivo, en una proteína que tenga triptófanos en su estructura primaria, la fluorescencia que pueden aportar la fenilalanina o la tirosina, se considera despreciable.

**Figura 1.8. Diagrama de Jablonski para el fenómeno de fluorescencia.** En el diagrama se representan con flechas los saltos de estados  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  junto a sus interconversiones internas y el fenómeno de fluorescencia, con sus respectivos tiempos (en segundos). Imagen extraída y modificada de “Fluorescence microscopy”, Jeff W Lichtman & José-Angel Conchello, doi:10.1038/NMETH817



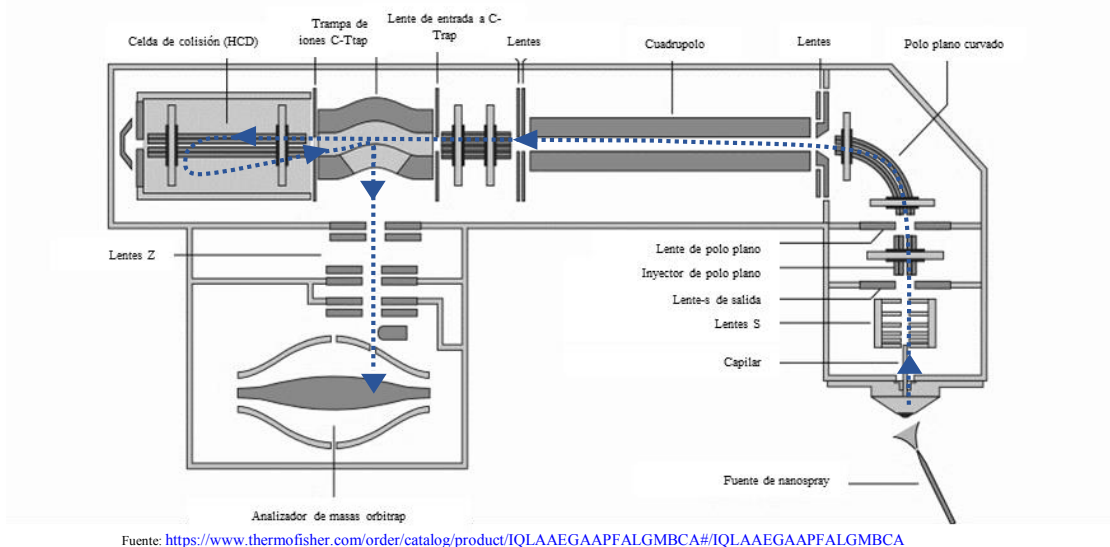
En el marco de esta tesis se tomará ventaja del denominado “efecto de relajación del solvente”. La polaridad del entorno en que se encuentra un fluoróforo dado influye profundamente sobre el espectro de emisión del mismo. Cuando un electrón es excitado al S1 en un entorno polar como un solvente acuoso, éste adoptará el estado energético más bajo ya que el exceso de energía vibracional se disipa en el solvente provocando un “reordenamiento” de los dipolos del solvente polar. Esa baja energética tendrá efecto sobre la energía de los fotones emitidos, afectando sus longitudes de onda, y así como se representa en el diagrama de la figura 1.9., la consecuencia será un corrimiento de todo el espectro de emisión a longitudes de onda menos energéticas generando el “corrimiento al rojo”. Como cabe esperar, si el entorno se vuelve más apolar, el mismo proceso, pero en sentido opuesto tendrá lugar, de manera que el espectro de emisión se correrá completamente a longitudes de onda más energéticas generando el “corrimiento al azul”. Este fenómeno es de particular importancia al evaluar la fluorescencia comparativamente. En este caso los 4 triptófanos que forman parte de la secuencia de apoA-I, le confieren la capacidad de fluorescer intrínsecamente y al evaluar el corrimiento espectral al rojo o al azul se puede deducir una mayor o menor exposición al solvente de estos entornos. Por lo tanto, se puede obtener información estructural de muy baja resolución, pero con una metodología muy simple según sus corrimientos espectrales.



**Figura 1.9. Esquemmatización del efecto de relajación por ordenamiento de los dipolos del solvente.** El efecto de relajación del solvente tiene lugar cuando la molécula excitada cae a un estado energético menor por el reordenamiento de los dipolos de las moléculas de solvente polar que rodean la molécula excitada. El fenómeno observable es un corrimiento espectral a longitudes de onda menos energéticas como indica el color de las moléculas: azul para longitudes de onda más energéticas o rojo para menos energéticas. Imagen tomada de: “Rotations in Excited ICT States - Fluorescence and its Microenvironmental Sensitivity”, David Liese and Gebhard Haberhauer, doi: 10.1002/ijch.201800032

### **1.9.2. Espectrometría de masas con tecnología orbitrap**

Utilizando los principios de la espectrometría de masas (MS), la tecnología orbitrap consta de un módulo compuesto por un electrodo exterior con forma de barril y un electrodo interior coaxial que forman un campo magnético donde se inyectan los iones. Una vez allí los iones dan vueltas alrededor del electrodo central, ya que quedan atrapados por el campo que es contrarrestado por la fuerza centrífuga ejercida por los mismos. Los iones recorren el eje también lateralmente en órbitas con forma de anillos (que oscilan alrededor del huso central) descritas proporcionalmente por la relación masa-carga ( $m/z$ ) de cada ion. Esto permite una separación extremadamente precisa aun utilizando muestras complejas. Este espectrómetro se adosa a un espectrómetro trihíbrido, aumentando así las prestaciones del equipo. El Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masas (CEQUIBIEM) de la Universidad de Buenos Aires (UBA), cuenta con un espectrómetro de masas Q-Exactive™, con tecnología Orbitrap® que se encuentra a disposición para análisis a terceros. Resumidamente como se muestra en el esquema 1.10., las muestras digeridas mediante alguna enzima proteasa de elección y sus productos separados por cromatografía líquida (LC) de fase reversa, se fragmentan a iones por electrovaporización y se inyectan en el espectrómetro. Los iones pasan por una serie de filtros, cuadrupolos y polos planos para quedar disponibles en una trampa iónica. Desde allí los mismos pueden dirigirse a una cámara de colisión de alta energía (HCD) o enviarse al módulo orbitrap. Variando los recorridos, se generan los espectros completos (MS/MS) para cada muestra. Finalmente, la comparación de los espectros MS/MS con bases de datos de fragmentación teórica se puede asignar la identidad a cada una de las proteínas detectadas incluso en el caso de mezclas complejas. Lo que permite esta identificación es principalmente la existencia de péptidos únicos, fragmentos peptídicos característicos de la proteína precursora que no se hallan en otra y que poseen una extensión de alrededor de siete aminoácidos (como mínimo).

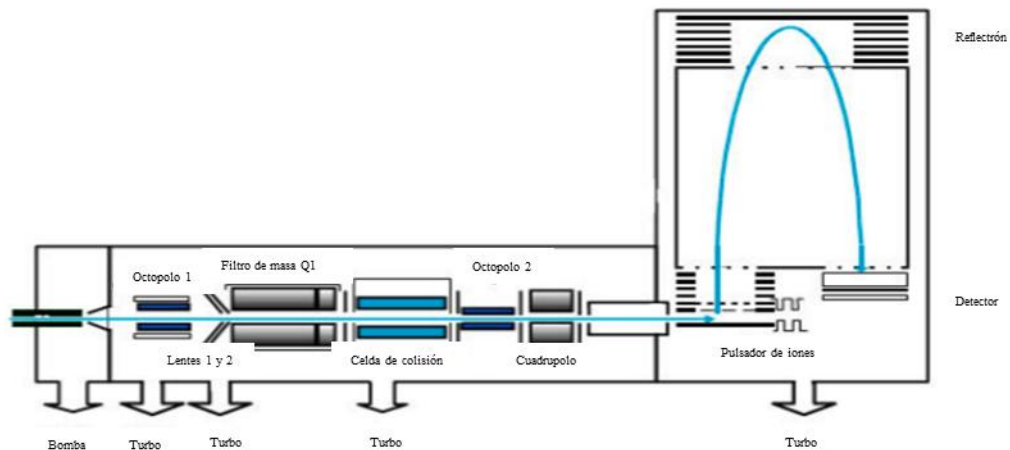


**Figura 1. 10. Plano del espectrómetro de masas Q-Extative.** El esquema resume el sistema de filtros y campos magnéticos utilizados por el equipo para la identificación de los iones inyectados por electrovaporización. Las flechas celestes muestran el recorrido utilizado para la identificación de proteínas hasta la generación de espectros full-MS mediante el módulo Orbitrap.

### 1.9.3. Espectrometría de masas tipo Q-TOF con tecnología iFunnel

Para los ensayos de entrecruzamiento químico se utilizó un espectrómetro LC/MS iFunnel Q-TOF Agilent 6550. La altísima sensibilidad del equipo permite análisis cuantitativos con alto grado de repetitividad que permite detectar compuestos a nivel de trazas. Utilizado en el Instituto de Enfermedades Metabólicas de la Universidad de Cincinnati, el instrumento se operó bajo las especificaciones detalladas en la sección 3.9.4. de Materiales y Métodos. Como se observa en el esquema 1.11., las muestras se inyectan en el espectrómetro luego de ser electrovaporizadas y los iones pasan por una serie de filtros y campos magnéticos para refinar el rango de  $m/z$  de los iones, de manera similar a lo mencionado en el aparatado anterior. En este equipo, el tubo de vuelo (*flight tube*) permite una mayor separación según el valor  $m/z$  de los iones, gracias a que aumenta el recorrido de los mismos. Esto ocurre ya que al llegar al extremo superior los iones son repelidos por el campo magnético del reflectrón, que los envía al detector ubicado en la base del tubo. A partir de la detección de los iones se generan los espectros

MS/MS, que luego se pueden analizar con motores de búsqueda y/o en softwares especializados.



Fuente: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3335-90231\\_TOF\\_Q-TOF\\_Concepts.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3335-90231_TOF_Q-TOF_Concepts.pdf)

**Figura 1. 11. Plano del espectrómetro de masas Agilent 6500 Q-TOF series.** El esquema resume el sistema de filtros y campos magnéticos utilizados por el equipo para la identificación de los iones inyectados por electrovaporización. Las flechas celestes muestran el recorrido de los iones para la identificación de los péptidos entrecruzados (xlinks).

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.6. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general planteado en esta tesis fue estudiar las bases moleculares que subyacen al efecto fisiopatológico observado en los portadores de la apoA-I<sup>K107del</sup> mediante aproximaciones biofísicas, proteómicas y mediante estudios celulares, utilizando como modelo de estudio proteínas recombinantes.

### 2.7. Objetivos específicos

- 1) Estudiar el efecto de la delección de la lisina 107 en la apoA-I, en la interacción con diversos modelos lipídicos mediante técnicas biofísicas de interacción con monocapas lipídicas, reconstitución de lipoproteínas y ensayos *in vitro* con lipoproteínas plasmáticas.
- 2) Estudiar las consecuencias estructurales vinculadas a la delección de lisina 107 mediante estudios de entrecruzamiento con BS<sup>3</sup> y análisis por espectrometría de masas y fluorescencia.
- 3) Estudiar los niveles de expresión de proteínas celulares, a partir del tratamiento diferencial con las proteínas Wt y K107del, utilizando técnicas de proteómica comparativa libre de marca radiactiva (*label-free quantification*, LFQ).

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1. Técnicas generales

#### 3.1.1. Expresión de proteínas recombinantes

El cDNA de ApoA-I humana (Wt) y su variante de delección apoA-I<sup>K107del</sup> (K107del) se insertaron en el vector de expresión pET30 modificado para introducir un sitio lábil al ácido fórmico: Asp-Pro entre el residuo 2 y 3 de apoA-I para cortar la etiqueta (Tag) de histidina N-terminal e introducido en bacterias BL21 (DE) *Escherichia coli*. Las bacterias se crecieron en medio Lauria Bertani (LB) en presencia del antibiótico kanamicina, a 37°C en agitación de 140-200 r.p.m. hasta alcanzar una  $DO_{600nm}=0,5$  comparando con medio LB sin bacterias. La producción de proteínas se indujo por el agregando IPTG a las bacterias y la subsecuente incubación durante toda la noche a 28°C.

#### 3.1.2. Purificación de proteínas recombinantes

Las bacterias se cosecharon por centrifugación durante 30' a 5.000 r.p.m. y los pellets bacterianos se lisaron mediante sonicación en buffer EQB (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25mM; NaCl 500mM; 0,05% azida sódico) en presencia de guanidina clorhídrica (Gnd) 3M para desnaturalizar los cuerpos de inclusión donde permanece gran parte de las proteínas. Luego los restos bacterianos se eliminaron por centrifugación a 15.000 r.p.m. durante 20' (en una o dos repeticiones, según la eficiencia de la clarificación). Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante el pasaje por una columna cromatográfica de afinidad a Níquel (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia. IMAC-Sepharose) a pH=8,0±0,2 para favorecer la ionización de la histidina, la columna fue previamente equilibrada con buffer EQB-Gnd al mismo pH. Todos los pasajes por columna se realizaron presencia de Gnd, para facilitar la elución de proteínas



contaminantes. La fracción de proteína se eluyó agregando imidazol 500mM al EQB-Gnd y las fracciones puras se trataron con ácido fórmico al 50% final durante 5 horas a 56,0°C para escindir el His-Tag de la proteína. El Tag se eliminó mediante un segundo pasaje por columna, quedando retenido en ella.

La pureza de las proteínas a utilizar se constató por densitometría mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Una vez purificadas las proteínas se estoquearon en buffer EQB en presencia de Gnd 3M a -70°C a una concentración aproximada de 1 mg/ml en el buffer de elución. Para llevar a cabo los experimentos, en todos los casos las proteínas se dializaron inmediatamente luego de descongeladas en 3 baños consecutivos con un mínimo de 1000 volúmenes durante al menos 3 h cada uno a 4°C, en el buffer que correspondiese con el experimento a desarrollar.

### **3.1.3. Técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida**

La mayoría de las determinaciones de pesos moleculares de proteínas y complejos lipoproteicos se realizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE). Como es sabido, el principio de la técnica consta de separar las moléculas cargadas en un campo eléctrico según su movilidad electroforética, siendo ésta intrínsecamente afectada por su masa, su carga y por su forma (en el caso de la electroforesis nativa), y únicamente por su carga/masa en el caso de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes por el uso de dodecil sulfato de sodio (SDS) como detergente. En todos los casos se utilizó el método de Laemmli [63] y estándares de peso molecular para la estimación de los pesos moleculares.

### **3.1.4. Electroforesis nativa**

Para la electroforesis nativa se utilizaron geles de poliacrilamida en gradientes que se eligieron considerando los pesos estimados de las muestras a separar. En la mayoría de los casos los gradientes se realizaron artesanalmente con la asistencia de un gradientizador pero en algunos casos los geles en gradiente fueron comerciales (4–15%

Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels). El fundamento del uso de gradiente se basa en que cada molécula o complejo molecular se desplaza dependiendo de la relación carga/masa hasta que el tamaño del poro impide su migración.

### 3.1.5. Electroforesis desnaturalizante

En el caso de la electroforesis desnaturalizante los geles que se utilizaron fueron en su mayoría de concentración constante, aunque en algunos casos se utilizó el gradiente de poliacrilamida para mejorar la definición de las bandas. Aquí los geles se prepararon en porcentajes variando de 10 a 16% de poliacrilamida, en consideración del peso molecular del sistema a separar según el siguiente criterio:

<b>Peso molecular</b>	<b>Porcentaje del gel</b>
4–40 kDa	20%
12–45 kDa	15%
10–70 kDa	12,5%
15–100 kDa	10%
25–100 kDa	8%

### 3.1.6. Sistemas de detección de proteínas

Para detectar las proteínas en el gel se utilizó la tinción con coomassie, coomassie coloidal, o tinción por plata (para proteínas totales por calle mayor a 0,25ng). En el caso de la tinción con plata las soluciones se prepararon en el momento y según corresponda se capturó la imagen antes de saturar las calles o luego de cortar la reacción con ácido acético al 10%. La adquisición de imágenes se realizó utilizando un escaner o bien usando el sistema Chemidoc (MP Imaging System, Biorad) cuando se tuvo acceso al mismo.

## **3.2. Técnicas para el cálculo de concentración proteica**

### **3.2.1. Mediante la absorbancia a 280 nm**

Para determinar la concentración mediante la absorbancia a 280nm se utilizó la ecuación de Lambert y Beer. Es importante considerar el tratamiento de las muestras antes de llevar a cabo la medición. 1) En todos los casos se midió la absorbancia en muestras libres de Gnd-HCl. 2) Para remover los agregados proteicos que contribuyen al *scattering*, todas las muestras se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10´ antes de tomar la lectura. Para la determinación de la concentración por absorbancia en todos los casos se utilizó el coeficiente de extinción molar  $\epsilon=32.430M^{-1}.cm^{-1}$ ; calculado en el server Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) para apoA-I con la secuencia recombinante.

### **3.2.2. Mediante la técnica del ácido bicinonínico (BCA)**

Para todas las determinaciones de concentración proteica menores a 0,1 mg/ml o en muestras con presencia de detergentes se utilizó el Mico BSA Protein Assay Kit (Thermo Scientific; Ref # 23235; Rockford, FL 61101, USA) acorde a las instrucciones del fabricante. El kit utiliza la técnica del ácido bicinonínico y es compatible con la presencia de detergentes en la muestra. Esta técnica permite la detección de  $Cu^{+1}$ , formado cuando el  $Cu^{+2}$  es reducido por las proteínas en un ambiente alcalino. Las muestras se incubaron en placas plásticas de 96 pocillos (Nunc) durante 1 a 2 horas a 37°C por triplicados y las lecturas se realizaron en el lector de placas (Beckman DTX 880) registrando la absorbancia a 560nm. El cálculo de la concentración proteica se determinó mediante regresión lineal por interpolación en curvas de estandarización utilizando seroalbúmina bobina libre de ácidos grasos (BSA).

## **3.3. Análisis estadísticos**

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism GraphPad 8.0 o Perseus versión 1.5.8.5. En todos los casos se realizaron análisis t-test, siempre asumiendo una distribución gaussiana (test paramétrico) no pareados y utilizando la corrección de Welch. Para el caso de los t-test múltiples se analizó cada par individualmente, utilizando la corrección de Holm-Sidak con un  $\alpha=0,05$  y sin asumir una desviación standard consistente. Para los t-test de Student de 2 muestras se utilizó un *false discovery rate* (FDR) de 0,05. Según corresponda el detalle estadístico se describe en los apartados correspondientes.

## **3.4. Técnicas utilizadas en los estudios celulares**

### **3.4.1. Técnicas de cultivo celular**

En todos los experimentos los monocitos THP-1 (ATCC® TIB202™) fueron cultivados hasta alcanzar confluencia en una estufa para cultivos celulares a 37°C con atmosfera de CO<sub>2</sub> del 5%; utilizando el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco Thermo Fisher Cat. Num. 23400021) preparado en agua miliQ ultrapura, suplementado con: 25mM HEPES; 2g/L de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>; 10% de suero fetal bobino (SFB) (Internegocios S.A. libre de endotoxinas; esterilizado por doble filtración a 0,1µm y radiación gamma a 25Ky). Para todos los casos se utilizaron células provenientes de cultivos menores a 10 pasajes. Estos stocks originales se obtuvieron por una única expansión de un criovial original y se almacenaron en N<sub>2</sub> (l) hasta su descongelado. Cabe mencionar que las células se conservan en dimetilsulfóxido (DMSO) que es citotóxico; por ello, para que la primera expansión sea exitosa es aconsejable “lavar” las células antes comenzar su crecimiento con PBS o con medio de cultivo.

Todos los elementos que entraron en contacto con las células fueron adquiridos ya estériles, o bien se esterilizados por autoclavado, y/o exposición a luz UV en el flujo laminar en tiempos no menores a 20'. Todas las soluciones o reactivos líquidos y medios de cultivo se esterilizaron por filtrado con un diámetro de poro de hasta 0,22µm. Aquellos insumos reutilizables (como pipetas de vidrio, frascos etc.) se lavaron intensamente y enjuagaron con agua destilada antes de esterilizarlos como se indica.

### **3.4.2. Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos**

En todos los casos las células se cuantificaron utilizando la cámara de Neubauer antes de su diferenciación. Debido a que las células THP-1 crecen en suspensión formando grandes grumos o *clusters*, para su adecuada cuantificación es importante pipetear reiteradamente (alrededor de 20 veces) para homogeneizar la dispersión celular buscando no inducir estrés, rayaduras sobre la botella ni generar espuma en exceso. Todos los experimentos se ensayaron conforme a las recomendaciones de los fabricantes de los insumos celulares.

Para diferenciar los monocitos a macrófagos, se realizó el tratamiento con ésteres de forbol, (forbol 12-miristato 13-acetato ó PMA) de pureza  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich) a una concentración final de 1 ng/ml por cada  $\sim 10^6$  células/ml, durante 24 h para formar una monocapa celular. La diferenciación de monocitos a macrófagos se evaluó por microscopía de contraste de fases gracias a que los macrófagos presentan adherencia a la placa, aumento del volumen citoplasmático, y algunas células pueden presentar morfología fusiforme. Estas características morfológicas permiten evaluar la diferenciación al microscopio utilizando magnificaciones de 400X en adelante.

### **3.4.3. Ensayos celulares con proteínas**

Una vez obtenidas las monocapas celulares, los macrófagos THP-1 fueron lavados 3 veces con PBS estéril precalentado a 37°C para remover el SFB proveniente del medio de crecimiento (se usó alrededor de 1/2 volumen del máximo recomendado por el fabricante de las placas). Para todos los tratamientos, co-tratamientos y controles, se utilizó RPMI sin suero (ss) como medio. En el caso de tratamientos con proteínas o sustancias solubles, éstas se esterilizaron por filtración por poros de 0,22  $\mu\text{m}$ , convenientemente antes o luego de disolverlas en el RPMI. Salvo que se indique lo contrario, en todos los casos la concentración proteica utilizada fue de 30  $\mu\text{g/ml}$  final y

los tiempos de tratamientos fueron de 12 h utilizando volúmenes de 2 ml por millón de células.

#### **3.4.4. Ensayos celulares con inductores e inhibidores de la vía Nrf2-Keap1**

Los estudios de inducción/inhibición de la vía Nrf2-Keap1 se desarrollaron en forma de co-incubaciones proteicas. Las concentraciones de proteína fueron 30 µg/ml final y las concentraciones de inhibidores o inductores se extrajeron de la bibliografía [61][64][65]. Todas las drogas utilizadas se prepararon como soluciones madre en el solvente menos toxico para las células que sea posible según las especificaciones técnicas del fabricante, y luego las alícuotas se agregaron al RPMI sin suero, en todos los casos. Las diluciones se filtraron en poro de 0,22 µm de diámetro convenientemente antes o después de ser agregadas al RPMI. La solución madre de ATRA se preparó en etanol al 100% y se conservó a -20°C. A partir de esa solución madre se prepararon las diluciones correspondientes y los ensayos se realizaron a una concentración final de ATRA igual a 2 µM directamente en RPMI (ss). El inductor ATO se diluyó en PBS y se esterilizó mediante filtración. Las concentraciones finales variaron entre 3 a 0,006 µM en RPMI (ss) comprobando su capacidad como inductor en ese rango.

#### **3.4.5. Extracción de proteínas celulares totales**

Concluidos los tratamientos, las placas se procesaron fuera de la esterilidad. Cada monocapa celular fue lavada 3 veces con PBS (una vez preparado, el mismo se esterilizó y conservó a 4°C para evitar posibles contaminaciones), éste se precalentó a 37°C inmediatamente antes de realizar la cosecha. Una vez lavadas las monocapas, se agregó rápidamente el buffer RIPA (150mM NaCl; 50mM Tris; 1,0% NP-40 ó Triton X-100; 0,5% deoxicolato de sodio; inhibidores de proteasas (recomendado); pH=8,0) a una relación aproximada de 180µl/10<sup>6</sup>células; preenfriado en hielo para evitar la degradación proteica. El alto contenido de detergentes presentes en este buffer

fundamenta la obtención de proteínas totales sin importar su ubicación subcelular. Las monocapas se escrapearon y los extractos se dejaron en agitación orbital media durante 30' en hielo. Posteriormente los extractos fueron centrifugados durante 20' a 12.000 r.p.m. a 4°C. Solo se utilizó el sobrenadante de cada tubo. Para el inmunoanálisis, estos sobrenadantes se fraccionaron y congelaron inmediatamente a -70°C sin sufrir más de tres descongelamientos posteriores.

En el caso de los extractos utilizados para su análisis por espectrometría de masas, las muestras se redujeron con ditioneitol (DTT) 20mM y posteriormente se oxidaron con iodoacetamida 50mM. Luego las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 20% final. El pellet conteniendo las proteínas fue lavado con acetona (preenfriada a -20°C) 3 veces (con 1/5 volúmenes del de RIPA inicial), para remover restos lipídicos. Finalmente, los restos de acetona se removieron por evaporado a seco bajo flujo de aire estéril. Las muestras se conservaron secas y congeladas hasta su resuspensión y tratamiento enzimático por parte del servicio de espectrometría de masas.

### **3.5. Determinación de proteínas diferencialmente expresadas mediante proteómica comparativa libre de marca radiactiva (LFQ)**

#### **3.5.1. Obtención de espectros completos (MS/MS) mediante cromatografía líquida (LC) seguida por espectrometría de masas Orbitrap**

Los extractos proteicos se obtuvieron acorde se describe en el apartado anterior 3.4.5. Luego se enviaron al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Allí las muestras fueron digeridas parcialmente con tripsina. Al digerido triptico se le realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales. Luego las muestras se liofilizaron en un Speed Vac y se resuspendieron en 10µl de ácido fórmico 0,1%. La separación de péptidos se realizó por cromatografía líquida (LC) en un nanoHPLC (Thermo Scientific,

EASY-nLC 1000) utilizando una columna de fase reversa C18 (Thermo Scientific, EASY-Spray Accucore P/N ES801) a 35°C utilizando un gradiente de 0,1% ácido fórmico en agua a 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo; acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap. La ionización de las muestras (volumen de inyección 2 µl), se realizó por electrospray en un ionizador EASY-SPRAY (Thermo Scientific) a 3,5kV. El análisis se realizó en un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo Orbitrap™ Q Exactive™ (Thermo Scientific); obteniendo los espectros completos Full MS y MS/MS, utilizando la mayor cantidad de ciclos de medición permitidos por unidad de tiempo, realizando MS/MS a los 12 picos que presenten mejor señal/ruido con un rango de exclusión dinámico suficiente para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución cromatográfica.

### **3.5.2. Asignación de identidad peptídica mediante el uso de softwares especializados**

La asignación de identidad peptídica fue generada en 2 softwares por separado: Proteome Discoverer versión 2.1 (Thermo Scientific) a cargo de CEQUIBIEM y MaxQuant versión 1.5.8.3 (de dominio público: <https://www.maxquant.org/>). El objeto de una doble identificación se basa en robustecer los resultados luego de la identificación peptídica. Los espectros crudos en formato .raw fueron analizados en ambos motores de búsqueda utilizando los mismos criterios de identificación y la misma base de datos. En este caso se utilizó como Base de Datos (origen): *Homo sapiens*, ID: UP000005640 Uniprot (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640>) actualizada al 2016. Los criterios de búsqueda fueron tripsina como enzima con un máximo de 2 *miscleavage*; 10ppm de tolerancia de masa para precursor; 0,05kDa de tolerancia de masa para fragmento; oxidación como modificaciones dinámicas y carbamidación como modificaciones estáticas. Sólo fueron consideradas para el reporte aquellas proteínas identificadas mediante al menos 2 péptidos únicos con alto nivel de confianza.



### 3.5.3. Análisis estadístico de las proteínas identificadas por orbitrap mediante t-test de dos muestras

Una vez obtenidas las listas de proteínas identificadas con sus respectivos valores de área espectrales, el procedimiento estadístico fue el mismo para todas las proteínas identificadas, independientemente por ambos softwares. Se realizó el análisis estadístico mediante el análisis t-test de dos muestras en el software Perseus 1.5.8.5 (de dominio público: <https://maxquant.net/perseus/>) utilizando los valores relativos de intensidad de cada proteína, previamente normalizados. Los valores relativos son el área bajo la curva del o los péptidos identificados como esa proteína, calculada de los espectros MS/MS.

Para normalizar las áreas se determinó la suma de todas las intensidades en cada una de las 9 muestras y se usó el valor máximo como normalizador. Luego se transformaron los valores de área aplicando  $\text{Log}_2$  y se agruparon los triplicados de cada set de datos en 3 grupos: control (Ctrol), Wt y K107del. Una vez agrupados, se realizó la comparación estadística y se reportaron las proteínas diferencialmente expresadas. Se seleccionaron aquellas proteínas cuyos niveles de expresión varíen en al menos 2 veces significativamente ( $p \leq 0,05$ ) para cualquier par comparativo: Ctrol/Wt; Ctrol/K107del ó Wt/K107del.

Para detectar dichas proteínas se realizó un gráfico de tipo volcán (*volcano plot*) donde se grafica el  $-\text{Log}$  del valor  $p$  en función de la diferencia del valor de área del par comparado. De esta manera se consideraron como proteínas de expresión diferencial todas las proteínas ubicadas en los cuadrantes superior izquierdo y derecho delimitados por las funciones. Estas funciones corresponden al valor logarítmico de  $p < 0,05$  y  $> 2$  veces la diferencia en niveles de expresión ( $\text{Log}_2 0,05$ ;  $\text{Log}_2 2$ ;  $\text{Log}_2 -2$  respectivamente). Este análisis se realizó únicamente sobre aquellas proteínas cuyo valor medio de área pudo determinarse lo que implica la existencia de al menos 2 valores numéricos de área.

Sin embargo, este método deja fuera de consideración aquellas proteínas cuyos valores de área se encuentren por debajo del umbral de detección del espectrómetro (es decir,

que no tengan un valor numérico). Para estudiar estas proteínas se aplicó un criterio de detección y búsqueda manual: sólo se reportaron aquellas proteínas que por triplicado presenten valores de área en alguna de las condiciones y que por triplicado no hayan sido detectadas para alguna de las condiciones. Estas proteínas que no se detectaron en alguno de los triplicados se consideraron como “ausentes”; y “presentes” si se encontró por triplicado en la misma condición.

### **3.5.4. Validación metodológica de las proteínas diferencialmente expresadas luego de los tratamientos con proteínas recombinantes**

Mediante la comparación de las listas de proteínas generadas por MaxQuant y Proteome Discoverer fueron seleccionadas aquellas proteínas coincidentes para ambos softwares tanto en su identificación, como en la validez estadística de sus niveles de expresión reportado. Las proteínas que cumplieron con este criterio se denominaron *proteínas robustas* (ver sección 3.5.2.) y fueron consideradas como candidatas a ser validadas mediante ensayos bioquímicos. Mediante Western blot se analizó el nivel de expresión de las proteínas robustas utilizando anticuerpos monoclonales provistos por SantaCruz Biotechnology Inc. (USA).

Para la detección mediante western blot de las proteínas seleccionadas, alícuotas del extracto proteico total fueron sembradas en los geles desnaturalizantes (SDS) en rangos de 3,0 a 80 µg/ml de proteína total. Los geles en gradiente fueron corridos en un equipo miniprotean plus (BioRad) hasta que el frente de corrida llegó a la base del gel. Se electrotransfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 1hs a 100v en baño de hielo. Las membranas fueron bloqueadas en buffer tris salino con agregado de Tween 20 al 0,05% v/v (TBS-T) con leche descremada al 3% durante 120'. Las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron con diluciones de 1:100 a 1:500 en TBS-T leche durante toda la noche en agitación a 4°C. Las incubaciones con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) se realizaron durante 3 h con diluciones 1:10.000 a temperatura ambiente en agitación. El revelado se realizó

variando los tiempos de exposición hasta obtener bandas nítidas en un equipo ChemiDoc Imaging System (BioRad). Los niveles de expresión se analizaron con el software ImageJ (de dominio público).

## **3.6. Técnicas aplicadas para los estudios de biofísica funcional mediante la determinación de la interacción proteína/lípido**

### **3.6.1. Construcción de liposomas unilamelares (SUV)**

Los liposomas unilamelares (SUV) se construyeron por sonicación. Para ello 1 mg de 1-Palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) o de mezcla de POPC:Colesterol (Col) en un radio molar 4:1, proveniente de una solución madre en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , se evaporaron a seco en tubos de vidrio con fondo redondeado (formando una película blanquecina) bajo flujo de  $\text{N}_2$  y posterior liofilización durante 1 h. Luego, sobre los lípidos secos a una concentración final de 1 mg/ml de lípidos, se agregó el complejo fluorescente formado por ácido dipicorínico (DPA) complejando al terbio (Tb) [Tb-DPA]; premezclados a una concentración de 15 mM de Tb, y 150 mM de DPA en buffer 10 mM Tris-HCl a pH 8,0. Por vortexeo intenso se formaron los liposomas multilamelares (MLV) y éstos se sonicaron para que rearreglen en liposomas unilamelares. El cambio de buffer externo sobre los SUV se realizó mediante cromatografía de exclusión por pasaje por una columna Superosa 6 HR 10/30, usando como buffer de equilibrado y elución Tris HCl 10 mM; NaCl 150 mM; y EDTA 12,5 mM; a pH 8,0 [66][67]. Para los experimentos de pérdida de contenido se seleccionaron las fracciones de SUV que presentasen mayor fluorescencia y los mismos se utilizaron dentro de los 5 días subsiguientes, conservándolos a 4°C.

### **3.6.2. Medidas de pérdida de contenido de SUV**

En las cubetas para fluorescencia de cuarzo conteniendo las proteínas a concentraciones que variaron de 0,015 a 0,3 mg/ml (en el buffer Tris-EDTA), se agregaron los SUV y

se homogeneizaron las muestras por pipeteo rápido durante 5 segundos. Se monitoreó entonces la emisión de fluorescencia ( $F$ ) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) fija de 544nm durante 10', excitando las muestras a una  $\lambda$  fija de 250nm. La variación en la intensidad de fluorescencia ( $\Delta F$ ) se calculó como la diferencia entre la  $F$  final ( $F_f$ ) y la  $F$  inicial ( $F_0$ );  $\Delta F = F_0 - F_f$ . La eficiencia en la pérdida de contenido inducida por proteínas se calculó considerando el  $\Delta F$  como porcentaje al considerar como 100% de pérdida de contenido la  $\Delta F$  inducida tras el agregado de SDS al 1% final [68][69].

### **3.6.3. Estudios realizados en monocapas lipídicas**

Las monocapas lipídicas se construyeron por goteo suave del POPC o POPC:Col (4:1) disueltos en  $Cl_3CH$  sobre la superficie del buffer. Para ello se cargó una cuba de teflón con 6,5 ml de PBS y se inmergió el papel de filtro tipo Wilhelmy KN 0005 (o Whatman CHR1) de 10 mm de ancho y 20,6 mm de perímetro (previamente enjuagados con el mismo buffer PBS para remover impurezas). Una vez estabilizada la presión superficial ( $\Pi$ ), se configuró como presión 0 y se agregaron los lípidos lentamente hasta alcanzar la presión inicial ( $\Pi_0$ ) deseada, obteniéndose ésta después de alrededor de 15-20' (para permitir la evaporación del solvente orgánico). Las proteínas se agregaron entonces cuidadosamente en la subfase a una concentración final de 1,5  $\mu g/ml$ , utilizando una jeringa Hamilton biselada y se monitoreó la variación de la presión  $\Delta \Pi = \Pi_f - \Pi_0$  hasta alcanzar el equilibrio. Todas las medidas se realizaron en una balanza NIMA Modelo 102A (NIMA Technology, Coventry, UK).

Todas las isothermas se adquirieron entre 26 y 27°C dentro de una campana de aislación acrílica, sobre una mesada antivibratoria por duplicado. Las variaciones de presión registradas se utilizaron para la construcción de las curvas de presión crítica ajustando la dispersión de datos a una recta. Para las isothermas de inserción de proteínas a interfases ( $I_f$ ) limpias se monitoreo la  $\Delta \Pi$  inducida por las proteínas directamente sobre la interfase buffer/aire hasta no registrar variaciones de  $\Pi$ .

### **3.6.4. Construcción de liposomas multilamelares (MLV)**

En este caso los liposomas se construyeron exclusivamente con dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Los MLV se construyeron secando 5mg de lípidos bajo flujo continuo de N<sub>2</sub> como se indicó anteriormente en 3.6.1. "Construcción de liposomas unilamelares". Sobre los lípidos secos se agregó 1ml de buffer Tris a pH 7,9 y el tubo se vortexeo durante 5' a temperatura ambiente, y luego se realizaron 5 ciclos de 30 segundos a 37°C y temperatura ambiente.

### **3.6.5. Medidas de clarificación de turbidez del DMPC**

En todos los casos las vesículas de DMPC se agregaron a las proteínas a una concentración proteica de 0,05 mg/ml en un radio molar de 145:1 (lípidos:proteína) y se monitoreó la Absorbancia (Abs) a 325nm (luego de homogeneizar por pipeteo suave durante 5 segundos) en cubetas de cuarzo [66][67]. Las medidas de Abs se determinaron a 24,0±0,5°C hasta que no se observaron variaciones en la misma. Para las comparaciones de las curvas, las mismas se construyeron a partir de las lecturas de Abs generadas en un mismo espectrofotómetro, ya sea un UV-visible Agilent Cary 8454 (Agilent); un Helios-β UV-Vis (Thermo Electron Corporation) o bien el lector de placas (Beckman DTX 880). Cabe aclarar que todos los elementos que entrasen en contacto con las muestras deben encontrarse a 24°C al momento de las mediciones ya que pequeñas modificaciones en la temperatura pueden alterar la cinética de clarificación. La dispersión de datos se ajustó convenientemente a un decaimiento exponencial (mono o bi según corresponda), constatando que el ajuste no presente un r menor a 0,98.

### **3.6.6. Estudios de formación de complejos lipoproteicos y HDL reconstituidas (rHDL)**

Para todos los casos estudiados se evaluó tanto la eficiencia en la formación de complejos lipoproteicos como los pesos moleculares de los mismos. Los ensayos se analizaron por densitometría sobre los geles escaneados. Para ello se recurrió al uso de

los softwares de dominio público ImageJ ó FIJI (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Los geles a utilizar fueron construidos con gradientes artesanales, variando los porcentajes de los mismos, acorde a los pesos moleculares que se pretendieron resolver (sección 3.4.6.).

### **3.6.7. Construcción de partículas lipoproteicas mediante micelización espontánea del DMPC**

Las partículas se formaron utilizando ratios molares de 154:1 de lípido:proteína, agregando los MLV de DMPC directamente sobre las proteínas a 0,05 mg/ml. Salvo que se indique lo contrario, las muestras se incubaron durante 72 h a 24,0°C en un baño térmico en tubos de tipo eppendorff de 0,5 o 1,5 ml en presencia de azida sódica 0,05%. Las muestras se corrieron en los geles inmediatamente después de incubadas. La presencia de proteínas en los geles se determinó utilizando tinción por plata en todos los casos.

### **3.6.8. Construcción de partículas lipoproteicas asistida mediante uso de detergentes**

El uso de detergentes como colato de sodio permite la estabilización de las regiones hidrofóbicas de los lípidos en estructuras de bicapa permitiendo a las proteínas configurarse sobre estas estructuras lipídicas por la baja en la energía necesaria en su reacomodamiento. En este caso se utilizó el método de diálisis de colato de sodio, descrito para la obtención de HDL discoidales reconstituidas (dHDL) [70]. Se utilizó un ratio molar de 40:60:1 de DMPC:colato:proteína y los MLV se construyeron directamente en el mismo buffer en que se encontrasen las proteínas y que se disolvió el colato.

Para ensamblar las partículas lipoproteicas primero se clarificaron los liposomas de DMPC por agregado del colato (40:60), mediante votexeo, y subsecuente incubación a

24°C durante 30'. Una vez finalizado este proceso, los lípidos se agregaron a las proteínas una concentración proteica de 0,05 mg/ml y las muestras se incubaron durante toda la noche a 24°C. El detergente se eliminó de las muestras por 3 diálisis consecutivas contra 1000 volúmenes de PBS a 24°C; durante un mínimo de 3h cada una.

### **3.6.9. Observaciones al microscopio electrónico de barrido (TEM)**

Las muestras fueron preparadas de acuerdo a las condiciones en las mediciones de clarificación antedichas. Se incubaron a 24°C durante 72 h y fueron utilizadas para la observación en un microscopio JEM 1200EX II, Jeol operando a 100 kV. Las muestras se aplicaron sobre grillas Formvar-coated durante 5' y se le realizó una tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2%.

## **3.7. Ensayos con lipoproteínas plasmáticas**

### **3.7.1. Interacción de proteínas recombinantes con LDL nativas**

Las LDL nativas (nLDL) se obtuvieron de sujetos adultos masculinos normolipidémicos cuyo índice de masa corporal era menor a 24,9 utilizando citrato de sodio como anticoagulante (en tubos BD Vacutainer tubes). Los sujetos humanos dieron su consentimiento informado de acuerdo con el protocolo aprobado y supervisado por la junta de revisión Institucional del *Cincinnati Children's Hospital Medical Center* [71].

Los ensayos de unión a nLDL se realizaron en PBS variando las concentraciones, los tiempos de incubación y la temperatura. Así se incubaron las nLDL a 1 mg/ml final, en relación 1:1 con las proteínas durante 15' a 24°C y alternativamente a 0,5 mg/ml en la misma relación durante 30'a 37°C agitando a 200 r.p.m. Luego las muestras fueron inyectadas en una columna simple de Sephadex 200, equilibrada previamente con PBS, y se monitoreó la absorbancia a 280 nm. Por ultimo las fracciones correspondientes a

los picos de elución se analizaron por SDS-PAGE. Para todos los experimentos se utilizó como control la incubación de las LDL con PBS a en la misma proporción que las utilizadas con proteínas recombinante.

### **3.7.2. Ensayos de interacción de LDL con células MOVAS preincubadas con proteínas**

Se utilizó la línea celular (*mouse vascular smooth muscles*) MOVAS. Las células se crecieron en placas de 96 pocillos durante 3 días para alcanzar la confluencia (para favorecer la expresión de proteoglicanos) y luego se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se agregaron las nLDL a una concentración de 1 mg/ml sobre las células que se incubaron previamente con las proteínas recombinantes a diferentes concentraciones (para inhibir la unión de las LDL a las membranas celulares). El grado de unión se determinó mediante bioluminiscencia, utilizando anticuerpos monoclonales contra apo-B conjugado a peroxidasa HRP. Los resultados se muestran en unidades de luz (arbitrarias). Los detalles pormenorizados de este estudio se encuentran bajo secreto intelectual ya que no han sido patentados aún, por su investigador.

### **3.7.3. Ensayos de interacción de proteínas con fracciones plasmáticas completas**

La fracción plasmática se obtuvo a partir de una extracción realizada sobre un sujeto sano con todos los parámetros normales y con un ayuno previo de 12 horas. La sangre colectada en presencia de citrato de sodio se centrifugó a 1000 x g por 15' a 4°C para obtener la fracción plasmática que se conservó a 4°C hasta su uso dentro de los siete días. La fracción plasmática se incubó directamente con las proteínas recombinantes conservando su Tag de histidina, para poder diferenciarlas de las apoA-I plasmáticas. Las incubaciones de apoA-I-Tag con plasma total se realizaron utilizando un radio de 1:1 mg/ml a una concentración final de apoA-I aproximada a 1 mg/ml. Para ello se



partió de una concentración inicial de apoA-I de ~4 mg/ml (esta concentración tan elevada se utiliza para evitar grandes cambios en los volúmenes que se separarán mediante FPLC).

Finalmente, alrededor de 345  $\mu$ l finales de muestra se filtraron e inyectaron en tres columnas en tándem de Supherdex 200 (10/300 GL; GE Healthcare Lifesciences, Pittsburgh, PA) previamente equilibradas en TBS. Se monitoreó la Abs a 280 nm y las fracciones se colectaron en volúmenes de 0,5 ml. Las fracciones correspondientes a las lipoproteínas se analizaron mediante SDS-PAGE en geles en gradiente 4-15%.

### **3.8. Entrecruzamiento de proteínas con bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS<sup>3</sup>)**

El bis[sulfosuccinimidil] suberato (BS<sup>3</sup>) es un agente entrecruzador homobifuncional que reacciona con aminas primarias libres. Así, únicamente las aminas laterales de los residuos de lisinas y el extremo N-terminal que se encuentren a una distancia  $\leq 11,4$  Å (el largo del brazo espaciador del BS<sup>3</sup>) tienen la posibilidad de quedar entrecruzados luego del tratamiento con el BS<sup>3</sup>. En todos los casos las proteínas se dializaron en buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=7,8 o PBS para remover la guanidina clorhídrica y se midió la concentración por absorbancia. Luego se realizó la dilución correspondiente para entrecruzar las proteínas y se procedió a realizar el entrecruzamiento con BS<sup>3</sup> acorde a las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). El BS<sup>3</sup> se utilizó siempre dentro del minuto desde su preparación para evitar la hidrólisis del mismo. En todos los casos las reacciones se frenaron por agregado de Tris 50mM final, incubando las muestras a temperatura ambiente por al menos 15'. El exceso de Tris y BS<sup>3</sup> sin reaccionar fue removido por diálisis en al menos 1000 volúmenes del buffer a utilizar acorde a los experimentos.

#### **3.8.1. Entrecruzamiento de proteínas monoméricas en estado nativo libre de lípidos**

En primer lugar, se realizó una curva de concentración (de 0,05 a 1,0 mg/ml) entrecruzando las proteínas en un radio molar 30:1 de BS<sup>3</sup>: proteína durante 3 h a temperatura ambiente sin agitación. Para entrecruzar las proteínas de manera intracatenaria, se diluyeron las mismas a 0,05mg/ml previo al tratamiento con BS<sup>3</sup>.

Los controles de concentración proteica se realizaron antes del entrecruzamiento y después del mismo (antes de su almacenamiento) utilizando el sistema de micro-BCA. Los controles de entrecruzamiento se realizaron mediante PAGE o SDS-PAGE y los stocks de proteína entrecruzada se conservaron a -20°C.

## **3.9. Técnicas aplicadas para los estudios de biofísica estructural**

### **3.9.1. Entrecruzamiento de oligómeros de apoA-I en estado nativo libre de lípidos**

El entrecruzamiento se realizó utilizando las proteínas a 1 mg/ml. Éstas se entrecruzaron a un radio molar 50:1 (BS<sup>3</sup>:proteína) durante 16 horas a 4°C [72]. Una vez agregado el BS<sup>3</sup>, las muestras se homogeneizaron con suavidad por una única inversión del tubo. El entrecruzamiento se constató por SDS-PAGE en gradiente 4-15%.

### **3.9.2. Medidas de fluorescencia intrínseca de triptófanos**

Todos los espectros de emisión de fluorescencia fueron adquiridos en un espectrofluorómetro Olis upgraded SLM4800 (ISS Inc, Champaign, IL). Para las medidas de fluorescencia intrínseca de triptófanos (Trp) los espectros de emisión fueron adquiridos excitando las muestras a 295 nm adquiriendo los espectros de emisión completos (300-700 nm) o bien, de 300 a 400 nm según corresponda. Todas las medidas se realizaron en cubetas de cuarzo para fluorescencia de 100µl (Agilent). En todos los casos a los espectros se les restó la contribución de fluorescencia generada por el buffer

(mediante el uso de un blanco correspondiente) y los espectros se normalizaron a su máximo de emisión.

### **3.9.3. Purificación de oligómeros de apoA-I entrecruzados**

Las proteínas se entrecruzaron a 1 mg/ml respetando lo indicado en la sección 3.8. “Materiales y Métodos” en 3 experimentos distintos. Cada triplicado experimental, conteniendo un total de 4 mg (en 4 ml) de proteína entrecruzada, se concentró a ~250 µl. Las muestras se filtraron en poro de 0,45 µm y se separaron por exclusión molecular por FPLC en tres columnas en tándem Superdex 200 equilibradas previamente con TBS y se monitoreó la absorbancia a 280 nm a un flujo de 0,3 ml /min a 4°C. Las fracciones fueron colectadas a 0,5 ml y la selección de los oligómeros puros se testeó por SDS-PAGE seguido de tinción por coomassie blue, sembrando ~8 µg de proteína total de cada fracción, por calle.

### **3.9.4. Análisis estructural de monómeros entrecruzados por LC-MS con tecnología iFunnel**

Las muestras para analizar por espectrometría de masas fueron los oligómeros entrecruzados purificados como se indica en el último párrafo de la sección 3.7.1. de materiales y métodos. La preparación para su corrida espectrométrica constó en un proceso de desalado contra  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM preparado con agua miliQ ultrapura en 3 baños de al menos 1000 volúmenes a 4°C (de al menos 3 h cada uno). Las muestras se digirieron completamente con tripsina para secuenciación (Promega) resuspendida en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM pH 7,8. La digestión se confirmó por ausencia de bandas en el gel 4-15% por SDS-PAGE seguida de tinción por coomassie blue. Los pellets con péptidos se secaron completamente en un speed-vac y se conservaron a -20°C hasta su resuspensión y corrida.

Para su análisis mediante espectrometría en un equipo Agilent 1200 Standard Flow UHPLC conectado al espectrómetro Agilent 6550 Q-TOF, los pellets peptídicos se

resuspendieron en ácido fórmico (pureza para secuenciación) al 0.1% (vol/vol) a una concentración final de 0.2 µg/µl y se incubaron durante 10' a temperatura ambiente (TA). Luego se centrifugaron a 10,000g durante 10'. Los sobrenadantes se trasvasaron a un vial para automuestreo y se inyectaron en una columna C18 IntegraFrit trap en un rango que varió entre 2,5 y 7 µg del producto de digestión.

Los espectros MS/MS se adquirieron operando el espectrómetro en el modo *positive-ion*: [M+H]<sup>+</sup>, en ciclos de escaneo TOF-MS (0.25-s con acumulación de tiempo en un marco de 350- a 1,500-m/z) seguido de 30 adquisiciones en modo MS/MS por ciclo. La energía de colisión configurada en la cámara HCD fue variable para obtener la mejor fragmentación posible, pero constante en todo el set experimental. Para un detalle pormenorizado de las condiciones adecuadas para la adquisición de espectros con este tipo de muestras, se recomienda consultar el protocolo estandarizado por Melchior *et al.*, 2017 [72].

### **3.9.5. Softwares especializados para en análisis de péptidos entrecruzados (xlinks)**

Para determinar las secuencias de los péptidos entrecruzados y los residuos involucrados en el entrecruzamiento se utilizó el programa *Spectrum Identification Machine for Cross-Linked Peptides* (SIM-XL) de dominio público (<http://patternlabforproteomics.org/sim-xl/>). La búsqueda se realizó sobre los espectros en formato .mgf introduciendo en los parámetros de búsqueda: *Cross-linker*, disuccinimidyl suberato, *Precursor ppm*: 10, *Fragment ppm*: 0, oxidación y formulación como modificaciones variables, 3 posibilidades isotópicas como máximo y no se consideró el umbral *threshold* (ya que la inspección de los espectros fue manual). Las listas de xlinks reportados se analizó manualmente uno por uno y se asignó un grado de confianza “Excellent” “Good” “Fair” y “Poor” a cada uno.

Para reportar los xlinks de máxima confianza se seleccionaron aquellos de confianza Excellent y Good que sean coincidentes en cada triplicado. En un segundo proceso de

depuración, se consideraron sólo aquellos péptidos reportados cuyos valores de iones positivos (MH+3) observados sean hasta  $\pm 0,05$  de los teóricos.

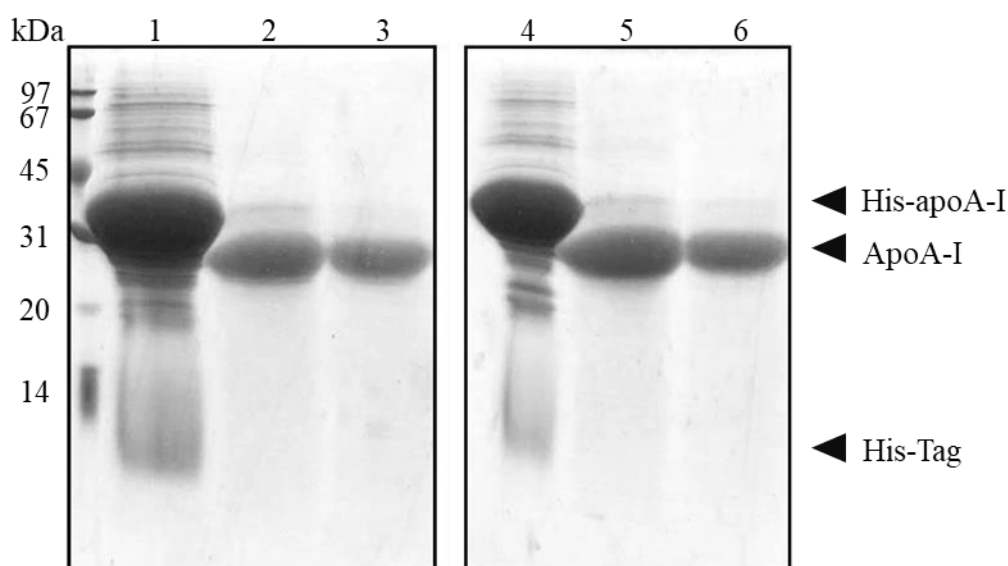
Utilizando los xlinks reportados se calculó el área bajo la curva para cada xlink, identificándola por coincidencia del valor de (m/z) M+3 y tiempo exacto de retención (RT) en el software MassHunter Qualitative Analysis Software B.07.00 (Agilent Technologies) inspeccionando manualmente el cromatograma de iones extraídos (EIC) sobre los MS/MS. Cada valor de área se normalizó manualmente al valor de área para el péptido (R)THLAPYSDEL(R), M+3=434,5500, RT=26,65 min (único péptido identificado por los softwares, carente de lisinas y argininas en su secuencia). Los valores de área normalizados se expresaron como valores porcentuales referidos comparativamente al valor de ese xlink para la Wt y se analizaron por t-test usando la corrección para comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Para la obtención de las proteínas recombinantes se buscó alcanzar la máxima pureza posible en cada purificación. Para ello en algunos casos se realizó un doble o triple pasaje por columna de afinidad de níquel previo al corte del Tag de histidina, posteriormente, o en ambos. En la figura 4.1. se muestra la pureza alcanzada, superior al 95% en cada purificación; cuantificada por densitometría utilizando ImageJ; luego del SDS-PAGE en un gel teñido con coomassie blue. Como se observa tanto la proteína Wt como la K107del presentan este alto grado de pureza.

Cabe mencionar que antes de realizar cualquier experimento, se constató el estado de las proteínas luego de su descongelamiento y remoción de la Gnd-HCl, mediante SDS-PAGE.



**Figura 4.1. Caracterización de la pureza de la apoA-I recombinan tipo Wt y K107del.** La pureza de las proteínas recombinantes se constató mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 16%. Las calles 1 y 4 muestran a las proteínas purificadas Wt y K107del respectivamente, luego del primer pasaje por columna IMAC. Las calles 2 y 5 muestran 30 $\mu$ g de las proteínas luego del segundo pasaje por columna, (sin el Tag de histidina) listas para estoquear. Las calles 3 y 6 muestran 15 $\mu$ g de las proteínas luego del segundo pasaje por columna, (sin el Tag) listas para estoquear.

## **4.2. ESTUDIOS DE BIOFÍSICA FUNCIONAL:**

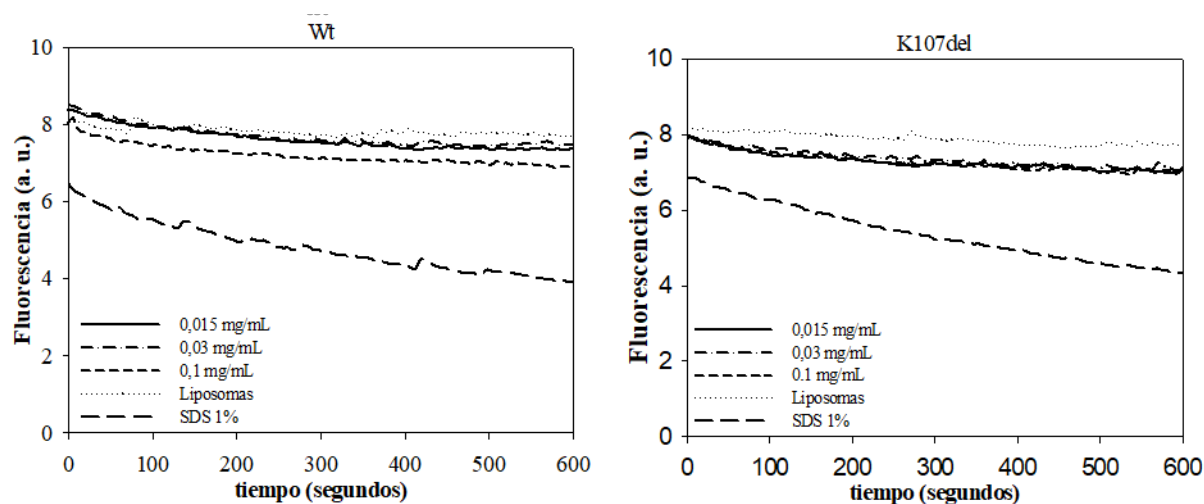
### **4.2.1. Estudios de pérdida de contenido de liposomas unilamelares inducido por proteínas**

Los estudios con liposomas son una herramienta ampliamente utilizada para caracterizar el efecto de una proteína determinada al interactuar con lípidos. Existen diferentes sistemas vesiculares orientados a diferentes fines; así los liposomas unilamelares pueden ser empleados para estudios de pérdida de contenido (*leakage* en inglés) mientras que liposomas multilamelares pueden emplearse para estudios de micelización (también denominada clarificación o *clearence* en inglés).

A fin de caracterizar comparativamente el efecto de la delección de K107 en apoA-I se construyeron los SUV cargándolos con ácido dipicolínico y terbio formando el complejo [Tb-DPA]. Éste complejo emite fluorescencia a  $\lambda_{544\text{nm}}$  cuando es excitado a  $\lambda_{250\text{nm}}$  ya que el DPA transfiere eficientemente la energía al Tb. El fundamento de la técnica consta cambiar el buffer en que se encuentran los liposomas por uno equivalente conteniendo EDTA, mediante cromatografía de exclusión. De esta manera si el buffer que rodea al liposoma tiene acceso al interior del mismo o viceversa, el Tb dejará de fluorescer al complejarse con el EDTA (en lugar del DPA). Los liposomas fueron ensamblados utilizando únicamente POPC o bien POPC:Col en una relación molar de 4:1. Esta composición (25% de colesterol) se utiliza como aproximación a sistemas biológicos reales. Como se menciona en la sección 3.6. de Materiales y Métodos, sólo aquellas fracciones conteniendo la mejor intensidad de fluorescencia fueron utilizadas. Antes de realizar las mediciones, se evaluó el efecto que pudiera tener la concentración proteica a concentraciones suboligoméricas. Para ello se monitoreó la pérdida de contenido de los liposomas construidos con POPC a concentraciones proteicas de 0,015; 0,03 y 0,1 tanto para la Wt como para K107del.

Como se observa en la figura 4.2. ambas variantes fueron capaces de inducir la pérdida de contenido de los liposomas, aunque no se observaron diferencias significativas en la variación de la fluorescencia en ninguna condición. Este resultado puede deberse al bajo

grado de eficiencia para inducir la pérdida de contenido a esas concentraciones bajas. Sin embargo, una posible interpretación de los resultados sugeriría que el efecto de interacción de monómeros tanto de Wt como de K107del con liposomas de POPC es independiente a la concentración.

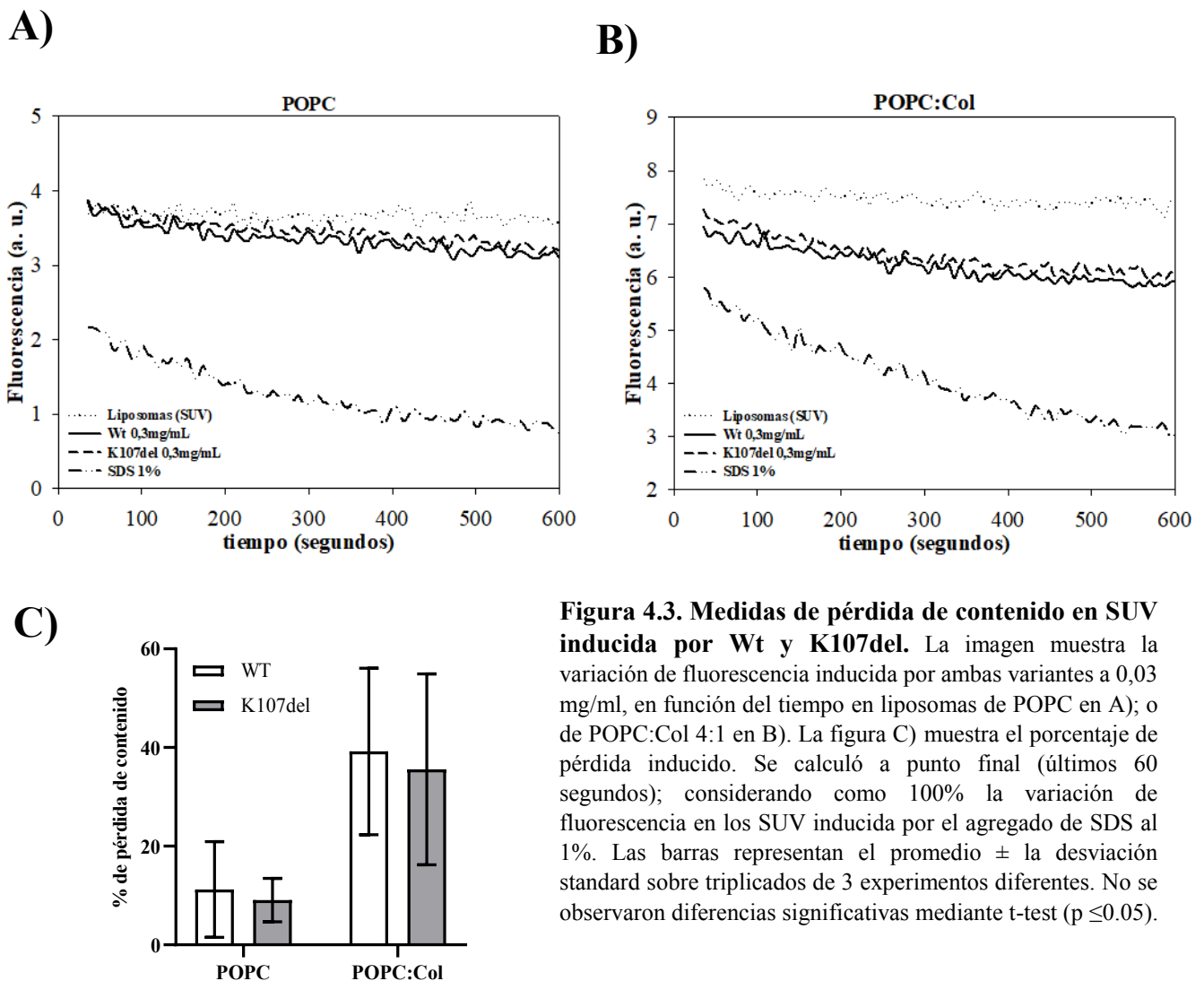


**Figura 4.2. Dependencia de la concentración proteica en la pérdida de contenido en SUV inducida por Wt y K107del.** Se evaluó la fluorescencia en función del tiempo desde el agregado de las proteínas excitando a  $\lambda=250\text{nm}$  el máximo de fluorescencia para el complejo [Tb-DP] únicamente en liposomas de POPC. Cada grafico corresponde a un set experimental con Wt o K107del respectivamente. Todas las curvas mostradas representan el promedio de 3 experimentos diferentes.

Para minimizar la posibilidad de que los estudios no muestren resultados contundentes a consecuencia de la baja eficiencia en la inducción de la pérdida de contenido acuoso, se decidió aumentar la concentración proteica a 0,3 mg/ml, sin embargo, no se pudo observar una mejora notable.



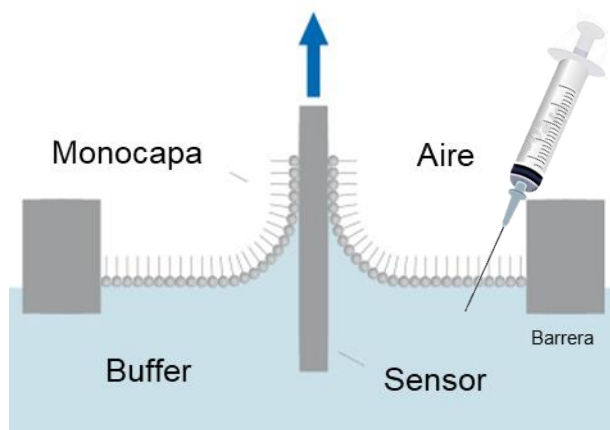
Como se observa en la figura 4.3. tanto la proteína salvaje como su variante de delección fueron capaces de inducir la pérdida de contenido de SUV ya sean enteramente de POPC o bien de mezclas 4:1 con colesterol. Ambas proteínas presentan curvas similares tanto en su cinética como en su variación de fluorescencia, evidenciando que no hay diferencias significativas entre la Wt y K107del, tanto para liposomas de POPC como de POPC:Col. Aunque no fue significativo estadísticamente, puede apreciarse un efecto levemente mayor en la pérdida de contenido en liposomas contruidos con la mezcla de POPC:Col. Estos resultados indican que la delección de la lisina 107 parece no afectar la capacidad de apoA-I para interactuar con SUV independientemente de la presencia o ausencia de colesterol.



**Figura 4.3. Medidas de pérdida de contenido en SUV inducida por Wt y K107del.** La imagen muestra la variación de fluorescencia inducida por ambas variantes a 0,03 mg/ml, en función del tiempo en liposomas de POPC en A); o de POPC:Col 4:1 en B). La figura C) muestra el porcentaje de pérdida inducido. Se calculó a punto final (últimos 60 segundos); considerando como 100% la variación de fluorescencia en los SUV inducida por el agregado de SDS al 1%. Las barras representan el promedio  $\pm$  la desviación standard sobre triplicados de 3 experimentos diferentes. No se observaron diferencias significativas mediante t-test ( $p \leq 0.05$ ).

## 4.2.2. Estudios de interacción de proteínas con monocapas lipídicas

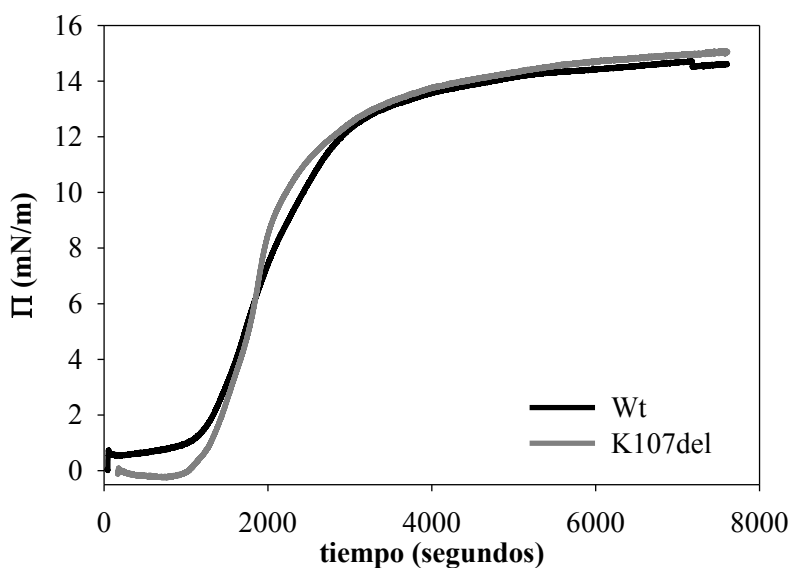
Para continuar con la caracterización de la interacción proteína/lípido de la K107del, comparativamente a la Wt, se buscó estudiar los cambios de presión superficial que pudieran sufrir las monocapas lipídicas utilizando las mismas composiciones que los SUV, al interactuar con las proteínas utilizando la balanza de Langmuir. Este estudio en conjunto con las medidas de pérdida de contenido permite evaluar el efecto de la curvatura en las membranas lipídicas, en la interacción de los lípidos con las proteínas.



**Esquema 4.1. Monocapa lipídica de Langmuir-Blodgett construida sobre la balanza de Langmuir.** El esquema muestra la disposición que adoptan los lípidos en una balanza de Langmuir. En una interface aire/agua se ubican con las regiones polares en contacto con el buffer acuoso y las colas hidrofóbicas en contacto con el aire. La flecha azul muestra la dirección en la que la presión es ejercida sobre el sensor cuando las muestras proteicas son inyectadas en la subfase (representado por la jeringa).

La balanza de Langmuir, en su diseño básico, permite censar variaciones en la presión superficial en unidades de fuerza sobre longitud ( $\text{mN/m}$ ) producidas por moléculas que generen perturbaciones en las interfases lipídicas, (donde  $\Delta\Pi = \Pi_0 - \Pi_f$ ). Para ello una balanza es suplementada con un dispositivo que esté en contacto de manera perpendicular a la superficie que sufrirá las modificaciones de presión. Como se muestra en el esquema 4.1. en la interfaz agua/aire es el sistema anfipático donde se dispondrán lípidos acorde a su estructura; es decir la región polar de los mismos directamente sobre el solvente acuoso y su región hidrofóbica hacia el aire (también “hidrofóbico”). Una vez agregados los lípidos en la interfaz, la balanza permite ajustar la presión inicial deseada (por agregado de lípidos o por compresión lateral de las barreras móviles) y cuando ésta se estabiliza pueden inyectarse las proteínas (o moléculas de interés) en la subfase con una jeringa biselada buscando generar la menor

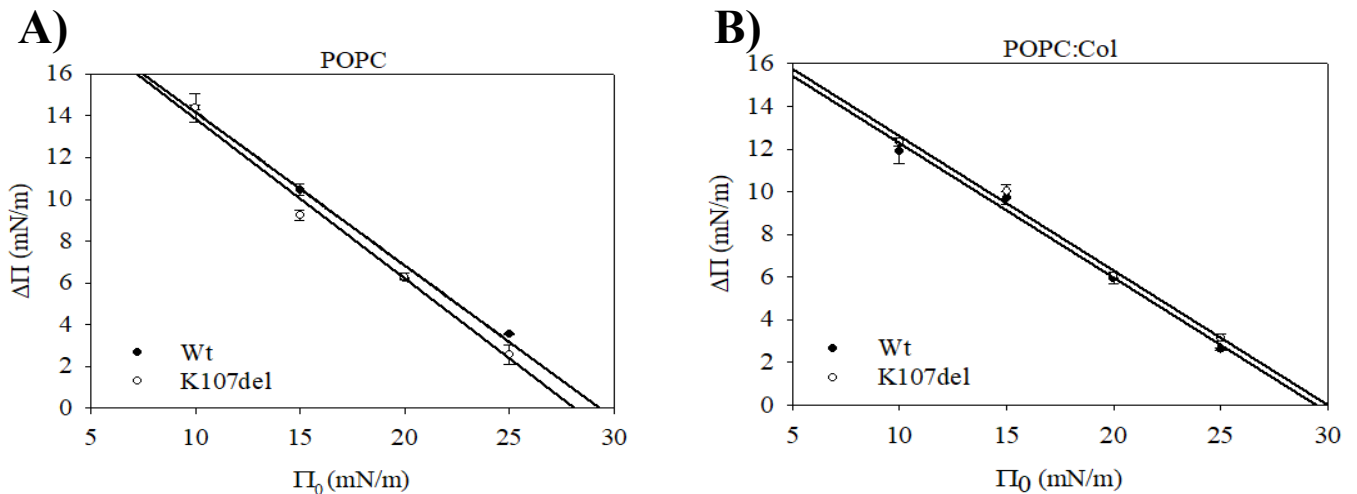
perturbación del sistema. Una vez agregadas las proteínas en la subfase se monitorean los cambios de presión hasta que nuevamente se estabilice el sistema considerando este nuevo equilibrio como “presión final”. Este sistema permite entonces evaluar el comportamiento que presenten las proteínas al interactuar con monocapas lipídicas planas (contrastando con las bicapas curvas de los LUV). Antes de comenzar con los ensayos se chequeó la capacidad de la Wt y de la K107del para interactuar con la interfaz (If) agua/aire; es decir, evaluar la capacidad de las proteínas para adsorberse a la If hasta su equilibrio final y la velocidad a la que lo hacen. Como se observa en la figura 4.4. ambas proteínas evidencian capacidad de ubicarse en la If; siendo inyectadas en una subfase de PBS. También presentaron velocidades de adsorción a la If similares, demorando en alcanzar el equilibrio aproximadamente 2,5 horas.



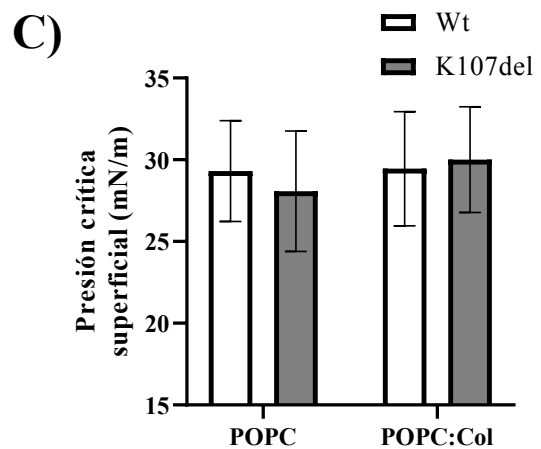
**Figura 4.4. Isotermas de adsorción de Wt y K107del a interfaces limpias.** Las curvas reflejan las isotermas de inserción para Wt y K107del a la interface PBS/aire. Todas las medidas se tomaron a 26°C durante aproximadamente 2,5 h. Cada curva refleja el promedio de dos isotermas distintas tomadas en diferente momento. La presión se registró desde la inyección de las proteínas en la subfase (tiempo 0) hasta que no se evidenciaron cambios de  $\Pi$ .

Posteriormente se construyeron monocapas de POPC o bien POPC: Col (4:1) acorde a las composiciones utilizadas en los ensayos de pérdida de contenido en SUV. En este caso los ensayos fueron realizados comprimiendo los lípidos a diferentes  $\Pi_0$  directamente al construir las monocapas.

Las variaciones de presión en función del tiempo se determinaron hasta no registrar cambios de  $\Pi$  y los  $\Delta\Pi$  se utilizaron para construir las curvas de presión crítica mostradas en la figura 4.5. Se comprobó que utilizando  $\Pi_0$  superiores a 20-25mN/m no es posible registrar variaciones de presión, por ello se tomaron las medidas a presiones inferiores y así se generó un gráfico de  $\Delta\Pi$  en función de la  $\Pi_0$ . Ajustando una recta a la dispersión de puntos, es posible determinar el “punto de presión crítica” por extrapolación al eje X; ya que este punto de intersección representa la presión a la cual las proteínas ya no pueden insertarse en la monocapa [73]. A su vez esta presión se presume como equivalente a la presión existente en las membranas plasmáticas de los sistemas biológicos [73].



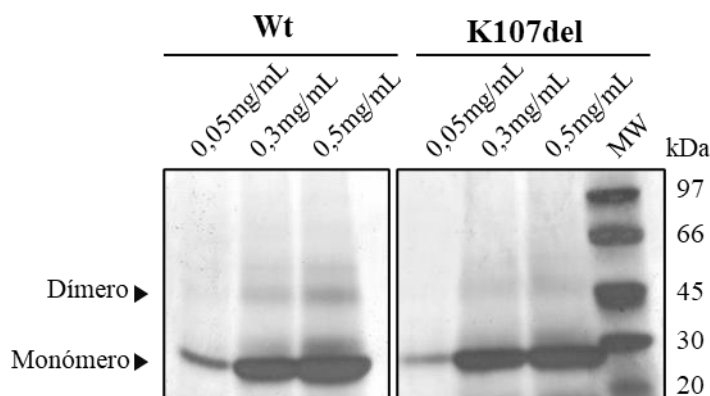
**Figura 4.5. Curvas de inserción de Wt y K107del monocapas de POPC y POPC:Col (4:1).** En los gráficos A) y B) se muestran las curvas de inserción de Wt y K107del respectivamente, construidas a partir de las variaciones de presión registradas partiendo de  $\Pi_0$  de 10; 15; 20 y 25 mN/m en monocapas de POPC o POPC:Col. Los círculos negros y blancos representan la variación promedio de dos isotermas de adsorción  $\pm$  el desvío estándar representado por las barras. Las líneas negras representan la función  $y = ax + b$  a la que se ajustó cada dispersión de puntos. El gráfico C) muestra los puntos de inserción o puntos de presión crítica calculado como promedio de 2 experimentos diferentes  $\pm$  la desviación estándar.



Cómo se observa en la figura 4.5. no se encontraron diferencias significativas entre Wt y K107del para ninguno de los sistemas estudiados (POPC o POPC: Col). La delección de la K107 no genera alteraciones significativas en las presiones críticas comparativamente a la Wt tanto en monocapas de POPC como de POPC: Col.

### 4.2.3. Entrecruzamiento intramolecular de Wt y K107del en estado monomérico

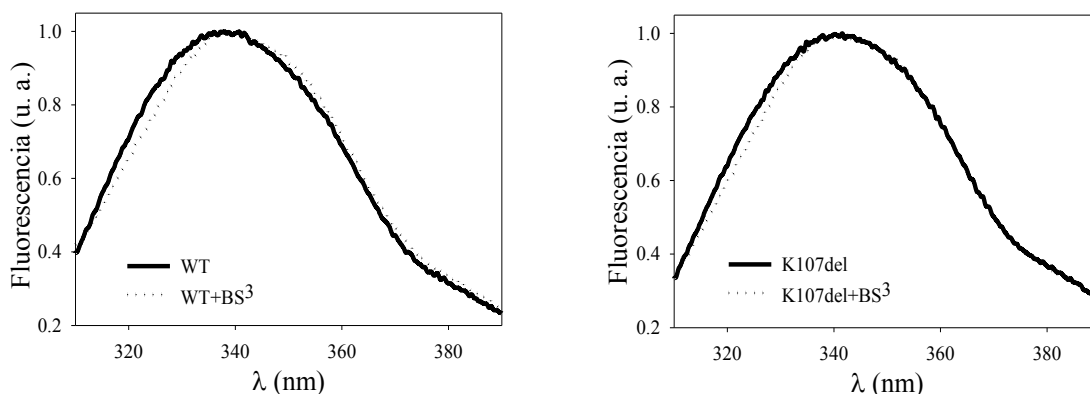
Como se detalló anteriormente, no pudieron evidenciarse alteraciones en la capacidad de interaccionar con lípidos debidas a la delección de la K107. Ante estos resultados se buscó encontrar alternativas para comprobar los efectos funcionales posibles debidos a la mutación. Por ello se pensó como estrategia la restricción conformacional por entrecruzamiento (*crosslinking*) químico con el agente entrecruzante BS<sup>3</sup>, con la idea de “fijar” a las proteínas en su conformación nativa monomérica y libre de lípidos.



**Figura 4.6. SDS-PAGE en gradiente poliacrilamida 4-15% de Wt y K107del entrecruzadas.** Los geles muestran las diferentes concentraciones ensayadas para su entrecruzamiento: 0,05; 0,3 y 0,5 mg/ml utilizando el mismo radio molar de proteína:BS3 (1:30) en todos los casos. En el gel revelado por tinción con plata, se observa la ausencia o presencia de multímeros luego de la tinción por plata. Los dímeros y monómeros fueron identificados por su peso molecular comparados con un estándar comercial de tipo kit de bajo peso molecular (MW). Las concentraciones de 0,05 mg/ml no presentaron oligómeros visibles.

Como se mencionó anteriormente, (1.1.2. Introducción) uno de los mecanismos propuestos para la formación de complejos lipoproteicos llevados a cabo por apoA-I consta de la formación de discos con sus hélices rodeando las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Para ello, las estructuras  $\alpha$ -helicoidales anfipáticas deben apuntar sus dominios hidrofóbicos al interior del complejo. Bajo estas consideraciones se sabe que

modificaciones en las mismas podrían alterar su capacidad para formar complejos lipoproteicos y/o también afectar su estabilidad. Como se ha propuesto, existe un equilibrio de interconversión entre el estado altamente flexible de la apoA-I monomérica en solución y los complejos discoidales cuando las proteínas son incubadas con lípidos, efecto que posiblemente se replique en el plasma [74][75]. Este proceso implica la necesidad de un reacomodamiento de la proteína en solución como “ramillete” de hélices o glóbulo fundido a la proteína formando parte del disco, como “cinturón” de hélices. Así al entrecruzar los dominios cercanos en proteínas a través de sus lisinas, en su estado monomérico libre de lípidos que se encuentran en solución; podría restringirse estructuralmente la funcionalidad de las mismas. Ello podría revelar diferencias funcionales antes “disimuladas” debido a la alta flexibilidad conformacional propia de apoA-I en solución (en este caso: un artefacto experimental). Se procedió entonces a entrecruzar las proteínas en su estado monomérico acorde se detalló en la sección 3.8. Como se aclara en esa sección, se comprobó la concentración adecuada a la cual realizar el entrecruzamiento para evitar la formación de multímeros. Como se muestra en la figura 4.6. se logró obtener monómeros entrecruzados intracatenariamente tanto de Wt como de K107del a concentraciones de 0,05 mg/ml. Los rangos de concentración a utilizar se decidieron ya que por debajo de 0,1 mg/ml se estima a apoA-I se encuentra mayoritariamente en su estado monomérico [76]. Para evaluar que los monómeros entrecruzados no hayan sufrido alteraciones conformacionales ya sea por el proceso de entrecruzamiento o bien por la adición del agente entrecruzante se analizó la exposición de triptófanos al solvente. La figura 4.7. muestra que tanto la Wt como la K107del entrecruzadas no presentan alteraciones ni en sus espectros de fluorescencia intrínseca ni en sus máximos.



**Figura 4.7. Fluorescencia intrínseca de Wt y K107del nativas y entrecruzadas.** La figura muestra el registro de emisión fluorescencia intrínseca en buffer Tris 20mM a pH=7,8 de la Wt y la K107del a 0,05 mg/ml antes (línea sólida) y después (línea punteada) de ser entrecruzadas. Los espectros se adquirieron de 310 a 410 nm, excitando a 295 nm. A los espectros mostrados se les restó la contribución del buffer y normalizaron por su máximo de emisión.

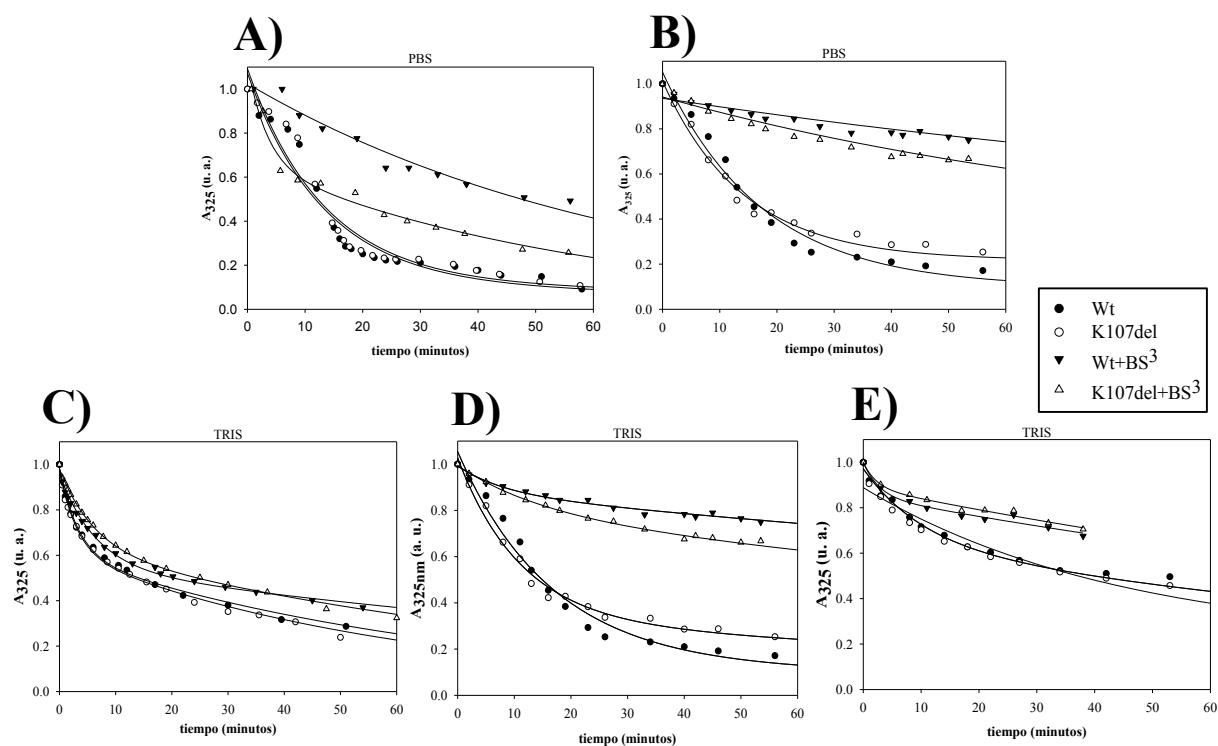
#### 4.2.4. Estudios de clarificación de liposomas multilamelares de DMPC

Junto con las medidas de pérdida de contenido en SUV y estudios en monocapas lipídicas, otro ensayo ampliamente utilizado para evaluar la interacción de proteínas con lípidos es la clarificación de vesículas multilamelares de DMPC. Este ensayo consta de monitorear la capacidad de las proteínas para micelizar MLV de DMPC que se registra como una disminución en la absorbancia (más precisamente del *scattering*) de la muestra. La formación de micelas se evidencia como la clarificación del sistema a partir del agregado de una molécula con propiedades anfipáticas debido a que la formación de micelas mucho más pequeñas que los MLV, genera una disminución de la dispersión de luz a medida que éstos se desarman. De esta manera, se registra la absorbancia de luz a  $\lambda_{325\text{nm}}$  en función del tiempo a la temperatura de transición de fases del DMPC (24°C) una vez agregadas las proteínas, como se detalla en la sección 3.6.5. (Materiales y Métodos).

Los ensayos se realizaron con Wt y K107del nativas y entrecruzadas para evaluar tanto el efecto de la delección en la proteína nativa, como el efecto debido al entrecruzamiento en estado monomérico para ambas variantes.

Como puede apreciarse en la figura 4.8. tanto la Wt como la K107del nativas presentan cinéticas de micelización indiferenciables entre sí, alcanzando también los mismos valores de absorbancia al equilibrio; concordantemente con los resultados reportados en los apartados previos. También, ambas variantes en su estado no entrecruzado presentan una mayor capacidad y velocidad de clarificación comparativamente a las proteínas entrecruzadas.

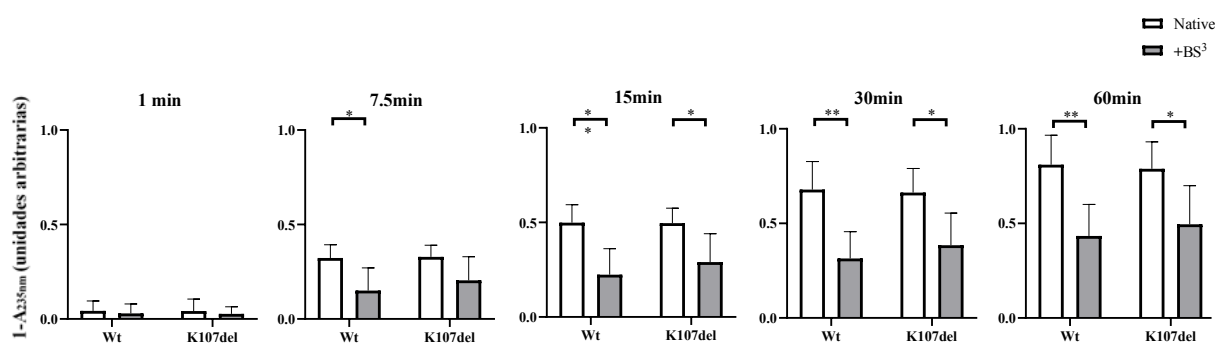
Si bien los experimentos se realizaron en diferentes equipos con el objeto de minimizar la variabilidad cinética, resultó altamente dificultoso conseguir curvas comparables entre sí (los posibles motivos se discuten en la sección 5.2. de la Discusión).



**Figura 4.8. Curvas de micelización de MLV compuestos por DMPC; en diferentes buffers.** Los gráficos muestran la variación de absorbancia registrada a 325nm al agregar los MLV de DMPC a la Wt y la K107del nativas y entrecruzadas. Cada curva se construyó por ajuste de la dispersión de puntos a una función de decaimiento exponencial doble de 4 parámetros  $y = ae^{-bx} + ce^{-dx}$ . Cada punto se normalizó al valor de absorbancia a tiempo=0. Las curvas A) a E) se construyeron a partir de lecturas llevadas a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 8454 (Agilent Technologies). Cada dispersión de puntos corresponde a (●) para Wt; (○) para K107del; (▼) para Wt+BS<sup>3</sup> y (△) para K107del+BS<sup>3</sup>.



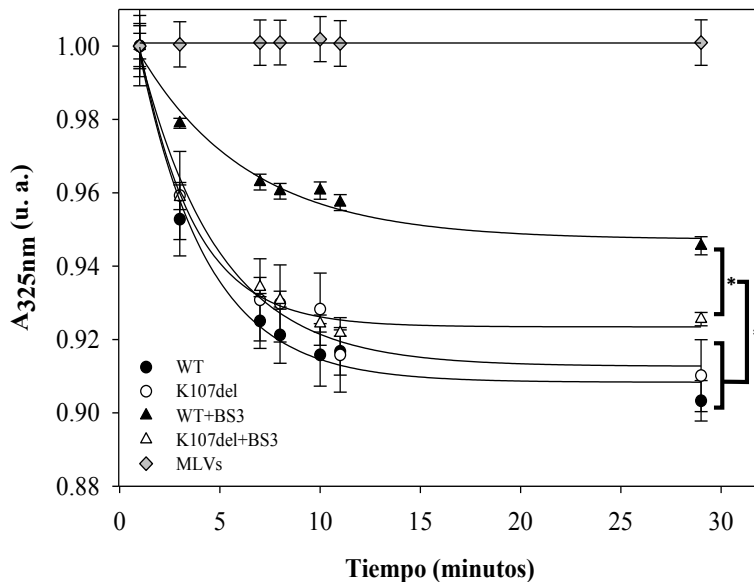
Considerando los cinco experimentos observados en la figura 4.8. se construyeron los gráficos mostrados en la figura 4.9. Al promediar todos los valores de absorbancia para la Wt y la K107del se puede observar que las diferencias estadísticamente significativas sólo se reportan entre las variantes no entrecruzadas y entrecruzadas. Sin embargo, aunque no se refleja en la estadística, parece evidenciarse que la K107del+BS<sup>3</sup> presenta una mejor capacidad de micelización comparada a Wt+ BS<sup>3</sup>.



**Figura 4.9. Eficiencia en la clarificación del DMPC a diferentes tiempos por Wt y K107del nativas y entrecruzadas.** Los gráficos muestran la eficiencia de micelización de cada proteína, calculada como  $1-A_{325nm}$  para cada tiempo indicado. Las barras muestran el promedio de cinco experimentos diferentes  $\pm$  el desvío estándar, determinados según la función  $y = ae^{-bx} + ce^{-dx}$  obtenida de las curvas de micelización del apartado anterior. Los símbolos asteriscos simples y dobles indican diferencias significativas con valores  $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$  respectivamente evaluados por t-test.

Para determinar la validez de esta observación, se decidió realizar tres experimentos simultáneamente, registrando la absorbancia directamente en el lector de placas. La desventaja de usar dicho equipo radica en la incapacidad de monitorear la temperatura exacta a la que se encuentran las muestras, lo que es fundamental ya que pequeñas variaciones en la temperatura de las muestras pueden modificar drásticamente la cinética de micelización. A pesar de ello, como todas las muestras se encontraban en la misma placa las posibles variaciones afectaron a todas las muestras por igual permitiendo compararlas entre sí. Como se observa en la figura 4.10, se pudo determinar que K107del+BS<sup>3</sup> se encuentra menos afectada en su capacidad de micelización comparativamente a la Wt+BS<sup>3</sup>. Asumiendo que la única variable entre Wt+BS<sup>3</sup> y K107del+BS<sup>3</sup> constó de las lisinas entrecruzadas (o lo que es lo mismo, de los dominios

interactuantes), podría afirmarse que K107del encuentra menos afectada su estructura por el entrecruzamiento, al interactuar con lípidos.

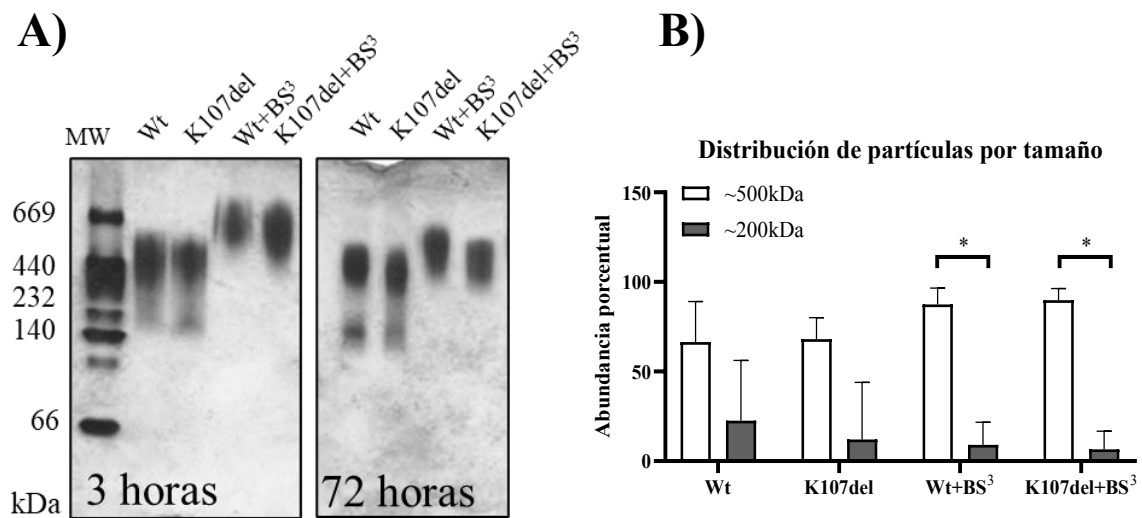


**Figura 4.10. Medidas de clarificación de DMPC por Wt y K107del, nativas y entrecruzadas en lector de placas.** Cada curva se construyó considerando un triplicado experimental luego de normalizar los valores a la absorbancia a tiempo 0 de cada muestra y ajustando los puntos a un decaimiento monoexponencial  $y = y_0 + ae^{-bx}$ . Los experimentos se llevaron a cabo simultáneamente a 24°C, utilizando una placa de 96 wells agitando orbitalmente la placa durante 10 segundos antes de cada medida. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  el desvío estándar. Los asteriscos muestran los valores diferenciales, estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) a punto final.

#### 4.2.5. Caracterización por PAGE de complejos lipoproteicos formados por micelización espontánea del DMPC

Es posible reconstruir las rHDL discoidales en el laboratorio por diferentes metodologías, como por el método de diálisis de colato de sodio, o bien por micelización espontánea a la temperatura de transición de fases del lípido (o mezcla) de elección. Para continuar caracterizando la interacción con lípidos por parte de la K107del comparativamente a la Wt, se construyeron complejos lipoproteicos, considerando tanto la composición lipídica y las metodologías mencionadas. Para determinar si la delección de la lisina 107 podría afectar a la estructura y/o el tamaño de los complejos lipoproteicos (y/o si los forma); las muestras proteicas se incubaron con MLV contruídos con DMPC, a 24°C con el objetivo de analizar el resultado de la micelización espontánea mediante PAGE. Para ello se continuó con el esquema de

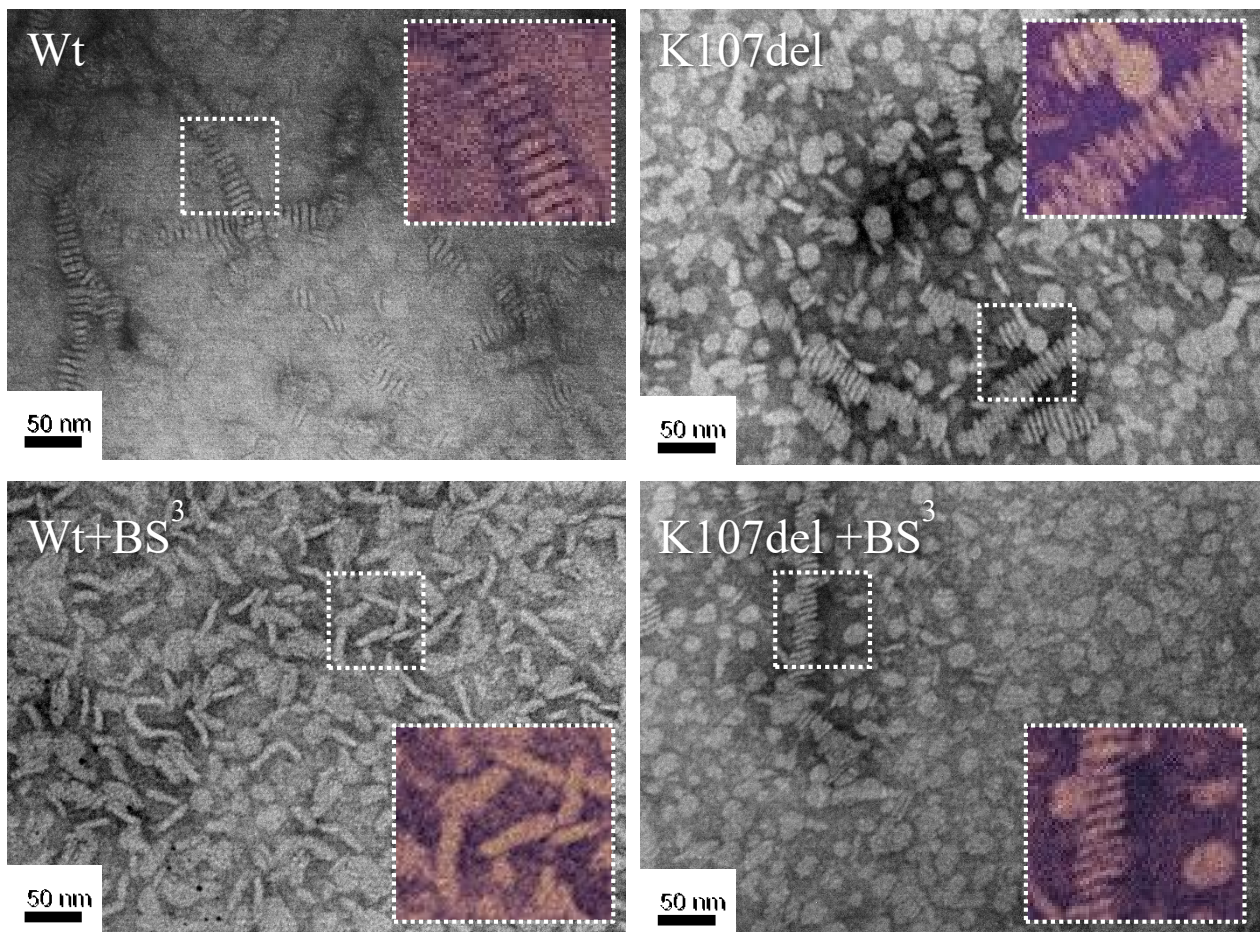
proteínas nativas y entrecruzadas antes planteado. Para evitar introducir nuevas variables se continuó con la relación molar utilizada para los experimentos de clarificación (1:145 proteína: lípido) y con los mismos lípidos (DMPC), pero se probaron diferentes tiempos de incubación a fin de determinar las mejores condiciones. Las muestras se analizaron al terminar los ensayos de clarificación (a punto final) luego de incubar las muestras a 24°C por 3 o 72 horas. La figura 4.11. muestra los complejos lipoproteicos obtenidos bajo estas condiciones y como se puede observar, los mayores tiempos de incubación permiten visualizar bandas más definidas en el gel, indicando una menor dispersión poblacional de partículas. A su vez, las proteínas entrecruzadas tendieron a formar los complejos de mayor tamaño en comparación a las proteínas nativas. Sin embargo, entre la Wt y K107del no se observan diferencias de tamaño en las partículas ni en su distribución poblacional ya sea evaluando el par comparativo Wt/K107del nativas o entrecruzadas.



**Figura 4.11. Caracterización por PAGE en gradiente 4-15% de lipoproteínas formadas por Wt y K107del nativas y entrecruzadas mediante micelización a 24°C.** A) Los gels muestran la distribución de partículas lipoproteicas formadas por micelización de MLV de DMPC a 24°C durante 3 y 72 horas respectivamente. B) El grafico de barras muestra la distribución por tamaño de las partículas lipoproteicas construidas a tiempos entre 3 y 72 h, con las variantes Wt y K107del entrecruzadas y no entrecruzadas. Las barras representan el valor medio obtenido de tres experimentos independientes  $\pm$  el desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas  $p < 0,05$  analizadas mediante t-test.

#### **4.2.6. Análisis morfológico de partículas lipoproteicas reconstituidas al microscopio electrónico**

Para completar la caracterización de los complejos lipoproteicos formados a la temperatura de transición de fases se decidió realizar un estudio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para comprobar la estructura tridimensional de los complejos observados anteriormente mediante PAGE. Para este estudio se utilizaron las muestras obtenidas luego de 72 h de incubación, ya que presentaron la menor dispersión poblacional (ver apartado anterior y figura 4.11.). Como se muestra en la figura 4.12. todas las muestras contuvieron complejos con estructuras discoidales. Sin embargo, sólo la Wt y la K107del en su estado nativo y la K107del+BS<sup>3</sup> conservaron la capacidad de formar los clásicos *stacks* (apilamientos con forma de monedas con gran cantidad de subunidades discoidales). Si bien, cómo se puede observar, todas las muestras fueron capaces de producir estructuras coincidentes con geometría discoidal, únicamente la Wt+BS<sup>3</sup> presenta gran proporción de estructuras aparentemente elipsoide-alargadas. Los discos de todas las muestras promediaron los 18±3 nm de diámetro y 3,5±1,5 nm de espesor, sin presentar diferencias significativas entre ninguna de las muestras.



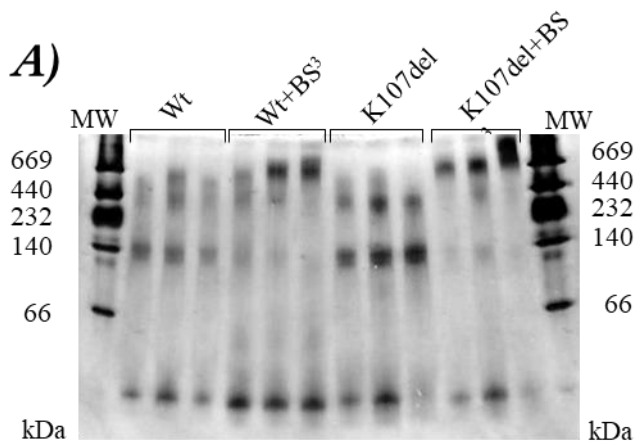
**Figura 4.12. Caracterización mediante TEM de lipoproteínas reconstituidas por micelización del DMPC a 24°C.** Los complejos lipoproteicos se construyeron por micelización de MLV de DMPC durante 72 horas a 24°C; a un radio molar de 145:1 (lípidos:proteína) utilizando una concentración inicial de 0,05 mg/mL de proteína. Las imágenes son representativas de las muestras indicadas (sobre 10 imágenes tomadas de diferentes regiones de la grilla Fromvard). Se modificó el brillo y el contraste sobre toda la fotografía de 8 bits para permitir la visualización de las partículas (en blanco y negro). Los rectángulos de línea discontinua indican regiones de la imagen que se amplificaron y a la que se le aplicó el plugin *Look Up Table* (LUT) “mlp-inferno” utilizando el software ImageJ, para resaltar la morfología de las partículas.

#### 4.2.7. Caracterización de complejos lipoproteicos asistidos por detergentes

Otro de los métodos ampliamente utilizado en la reconstitución de rHDL consta de la obtención de micelas mixtas con el detergente colato de sodio, que se elimina posteriormente por diálisis. El fundamento de la técnica se basa en la asistencia que el

detergente ejerce para formar una micela mixta lípido-detergente. Esto facilita la formación de un complejo lípido-detergente-proteína, ya que la proteína puede emplazarse en las micelas mixtas con mayor facilidad que interaccionando directamente con los MLV. Luego, por diálisis se elimina el colato de sodio del complejo mientras que la proteína permanece interactuando con los lípidos formando así el complejo lipoproteico, libre de detergente.

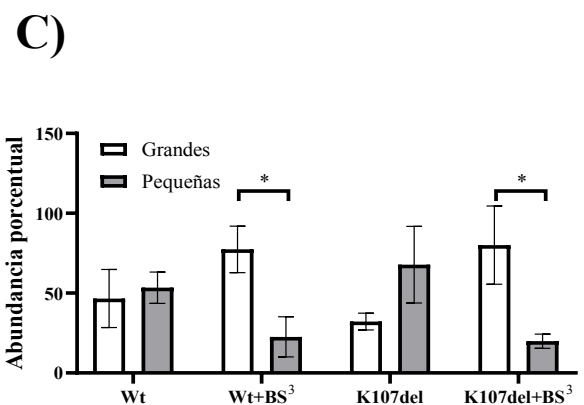
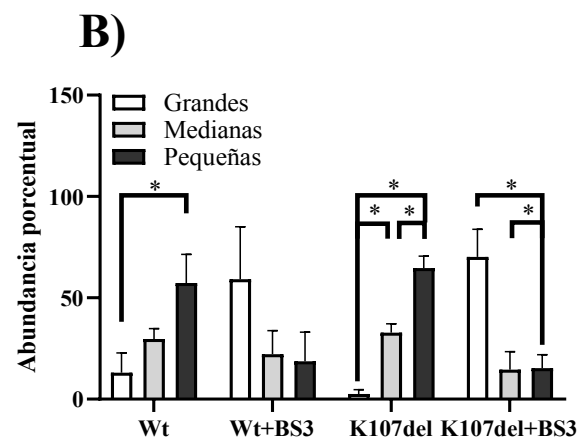
En este caso se utilizaron mezclas de DMPC:colato en relaciones molares de 60:40:1 (detergente: DMPC: proteína) a una concentración de proteína final de a 0,05 mg/ml. Se optó por continuar con el uso de DMPC como el componente lipídico de los



**Figura 4.13. Caracterización mediante PAGE de geles en gradiente 4-15% de lipoproteínas formadas por Wt y K107del nativas y entrecruzadas mediante diálisis de colato de sodio.**

**A)** En la imagen se observa la distribución de partículas lipoproteicas formadas mediante el método de diálisis de colato de sodio. El gel muestra tres experimentos diferentes ensayados para cada proteína; luego de la tinción por plata. Las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando el ImageJ.

**B)** El gráfico de barras muestra la distribución por tamaño de las partículas lipoproteicas a partir de las medidas densitométricas obtenidas de A) expresadas como abundancias porcentuales considerando la suma de todas las densidades de una calle como el 100%. **C)** sobre los valores obtenidos en A) se sumaron las densidades de las poblaciones medianas y grandes y se calculó la abundancia porcentual nuevamente. Las barras representan el valor medio obtenido de tres experimentos independientes  $\pm$  el desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas  $n < 0.05$



complejos para introducir la menor cantidad de variables por experimento y se analizó por PAGE la formación de partículas.

Como se observa en la figura 4.13., mediante esta técnica se generaron 3 poblaciones de partículas de distintos pesos moleculares. Para simplificar el análisis y permitir un marco comparable con las partículas formadas por micelización espontánea (apartado anterior), las tres poblaciones se agruparon por peso molecular en dos *tipos* de partículas: las *grandes* formadas por las subpoblaciones de entre 600 y 500kDa; y las *pequeñas* de aproximadamente 140kDa. Tal como se observó previamente en la formación de complejos por micelización espontánea (en el apartado 4.2.5. de resultados), sólo las partículas formadas por las proteínas que se entrecruzaron presentaron una pérdida en su capacidad de formación de complejos de menor tamaño.

#### **4.2.8. Ensayos de interacción proteica con nLDL**

Para completar el estudio funcional utilizando métodos más aproximados a los sistemas biológicos, se llevaron a cabo análisis con las variantes Wt y K107del, directamente sobre lipoproteínas nativas obtenidas de plasma o bien sobre plasma total como se detallará adelante. Estos ensayos se basaron en experimentos de coincubación de las variantes recombinantes directamente con las lipoproteínas plasmáticas, variando las condiciones de concentración y temperatura. El objetivo de dicho estudio fue evaluar el efecto funcional de la delección de la K107 directamente en lipoproteínas plasmáticas.

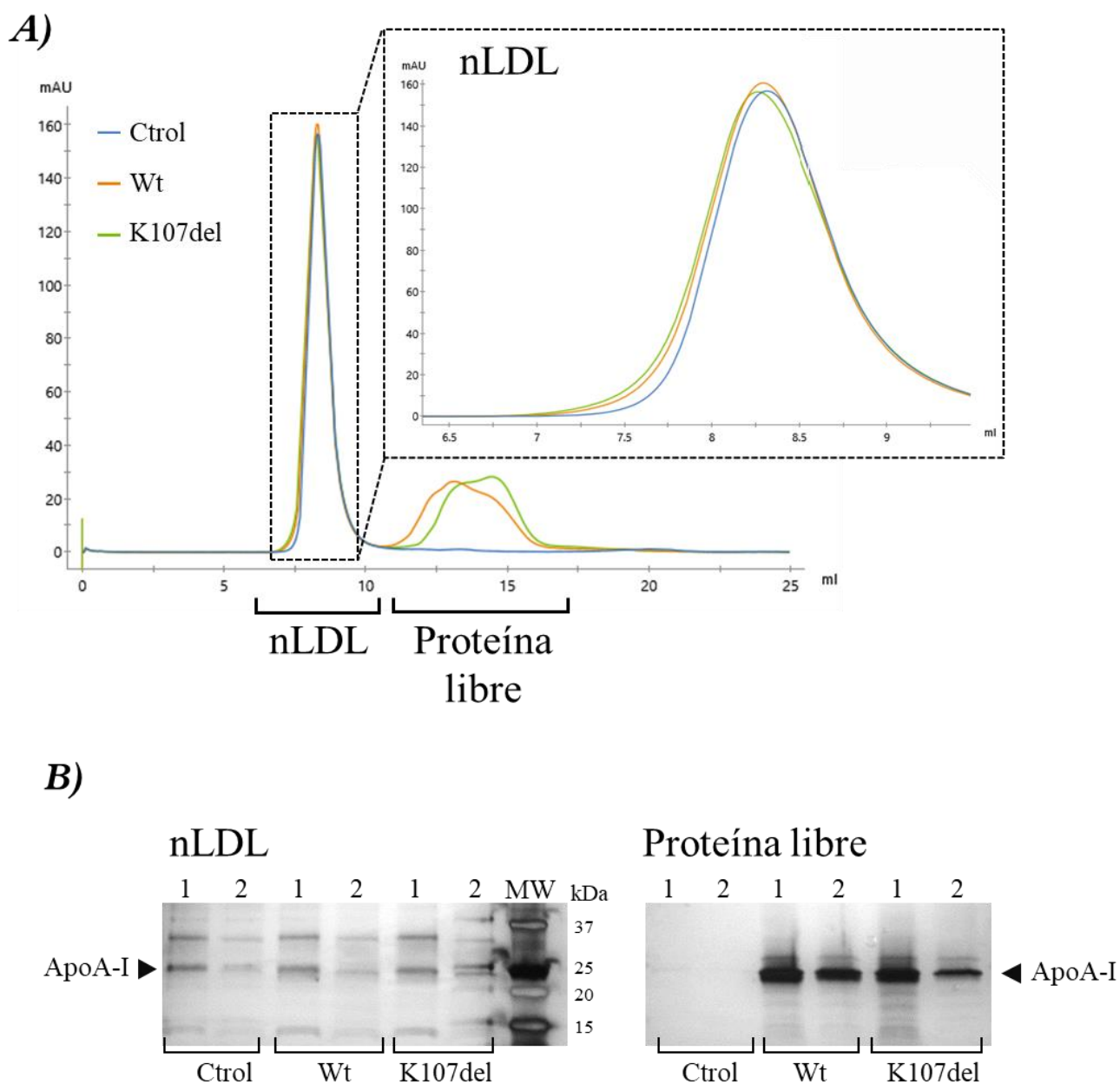
En este ensayo se buscó evaluar la unión (o interacción) de las variantes recombinantes a LDL nativas (nLDL) frescas, purificadas de plasma humano. Para ello, tanto la Wt como la K107del fueron coincubadas con las nLDL variando las concentraciones, los tiempos y las temperaturas en el tratamiento. En la figura 4.14. se muestra como ejemplo los cromatogramas resultantes de la separación por un pasaje por una columna simple de superdex 200. No se observaron diferencias ni en la intensidad, ni en el perfil de los cromatogramas generados por ambas variantes. Este resultado indica que cantidades similares de proteína recombinante se encuentran presentes en la fracción lipoproteica en ambos casos. A su vez estos cromatogramas presentan una área bajo la curva mayor que el control incubado con PBS, lo que indicaría que la proteína recombinante se

“unió” a las nLDL. A su vez, la proteína no asociada a las nLDL eluyó posteriormente en un pico separado.

Si bien los perfiles cromatográficos muestran que no hay diferencias en los niveles de asociación a nLDL, utilizando alícuotas correspondientes a los picos del eluido se realizó un análisis por SDS-PAGE para comprobar este resultado. Como se muestra en la figura 4.14. mediante electroforesis tampoco se evidenciaron diferencias en los niveles de Wt y K107del asociados a las nLDL.

Las diferentes variables experimentales se ensayaron en un único experimento cada una. Los cromatogramas de la figura 4.14., muestran un experimento llevado a cabo en relación 1:1 (nLDL:apoA-I) luego de incubar las muestras durante 15' a temperatura ambiente. En la imagen se muestran los resultados del experimento realizado a la misma relación nLDL:proteína pero a concentraciones de 1,0 mg/ml final luego de incubar las muestras durante 30' a 37°C en agitación. Si bien cada una de las variantes introducidas se analizó en un único experimento, se observa una coincidencia en los resultados por FPLC y electroforesis, a pesar de la gran modificación en las variables experimentales mencionadas arriba. Esta concordancia sugiere que no existen diferencias en los niveles de Wt o K107del unidos a nLDL a pesar de no contar con un análisis estadístico.





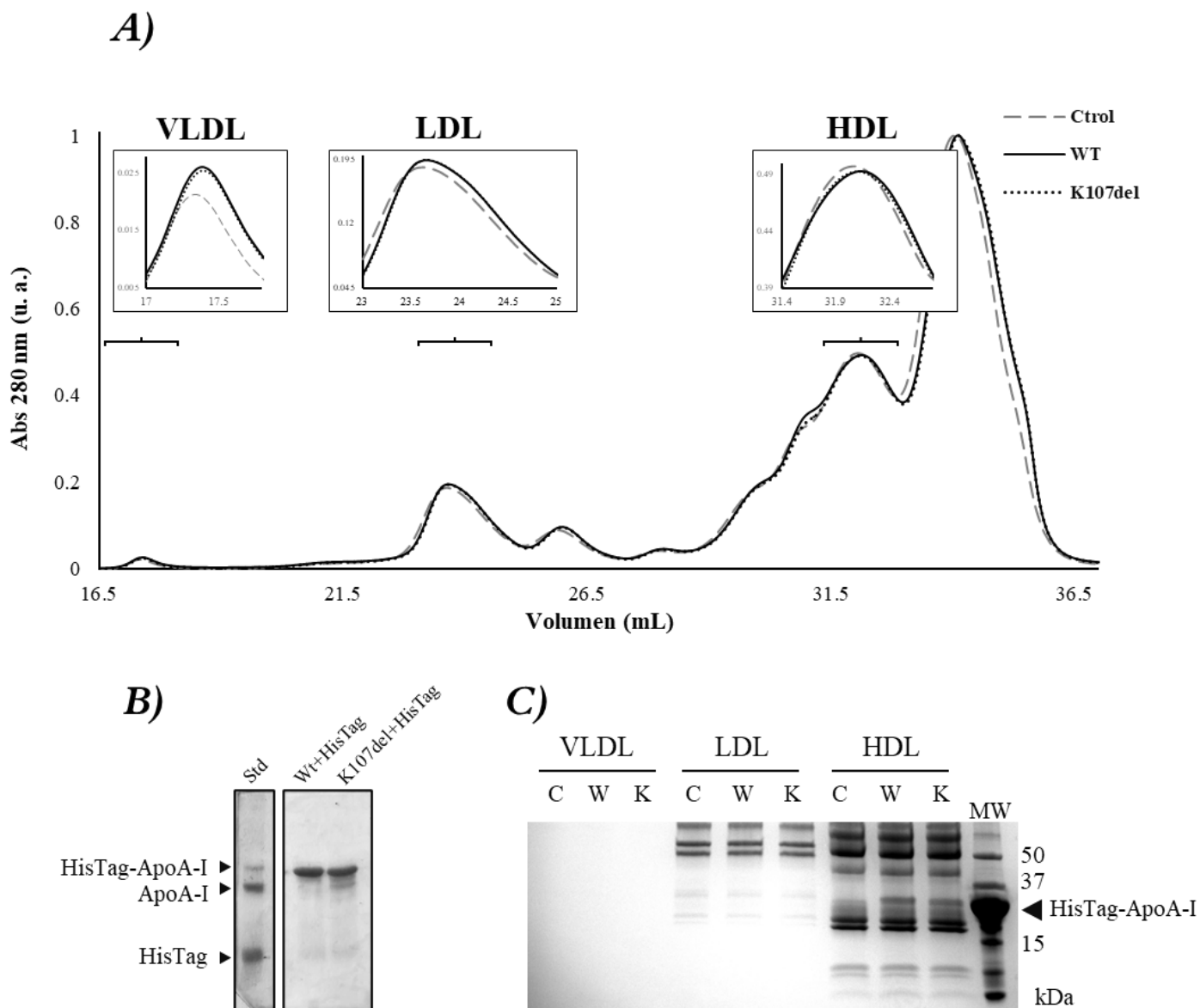
**Figura 4.14. Ensayos de interacción entre nLDL y la Wt y K107del nativas.** **A)** Cromatogramas obtenidos al monitorear la absorbancia a 280nm luego de incubar las variantes nativas con nLDL en relación 1:1 a 1 mg/ml final durante 15' a temperatura ambiente (TA). La separación cromatográfica se realizó a 4°C utilizando una columna Supherdex 200 equilibrada previamente con PBS esterilizado por filtración (el mismo buffer fue utilizado como tratamiento control). **B)** Se utilizaron alícuotas correspondientes con los picos cromatográficos para analizar la presencia de apoA-I en las fracciones señaladas. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en gels de gradiente 4-15% comerciales por tinción con plata en la imagen se muestra un fragmento del gel. Las calles (1) corresponden a muestras incubadas 15' a TA en relación 1:1 (nLDL:proteína) a 1 mg/ml final (tal como refleja la imagen A). Las calles (2) corresponden a muestras incubadas 30' a 37°C en relación 1:1 (nLDL:proteína) a 0,50 mg/ml final (cromatograma no mostrado).

#### **4.2.9. Ensayos de unión de proteínas Wt y K107del a lipoproteínas en plasma total**

Para continuar evaluando el efecto de la delección de la K107 en su interacción con lipoproteínas plasmáticas, se incubó la fracción plasmática completa, directamente con las variantes Wt y K107del y se estudió el perfil lipoproteico en su totalidad.

Aquí como estrategia se utilizaron ambas variantes conservando su Tag de histidina. De este modo, se utilizaron proteínas purificadas a las que no se les removió el Tag de histidina por corte con ácido fórmico (ver sección 3.1.2. “Purificación de proteínas recombinantes”). Si bien estas proteínas conservan el Tag que podría afectar sus propiedades, este ensayo debe considerarse como un modelo de aproximación. El objetivo de utilizar las proteínas conservando su Tag, fue poder distinguir la apoA-I propia de las lipoproteínas plasmáticas de aquella agregada exógenamente en el experimento (apoA-I+Tag), debido a que tanto apoA-I del suero, como la Wt y la K107del serían indistinguibles entre sí mediante análisis por PAGE, SDS-PAGE o FPLC. En cambio, las proteínas recombinantes conservando el tag presentan una masa de aproximadamente 32kDa lo que permitió distinguir las fácilmente en comparación a la apoA-I plasmática de 28kDa. Cabe aclarar que para llevar a cabo estos experimentos las variantes conservando su Tag fueron de un alto grado de pureza como se puede observar en la figura 4.15.B).

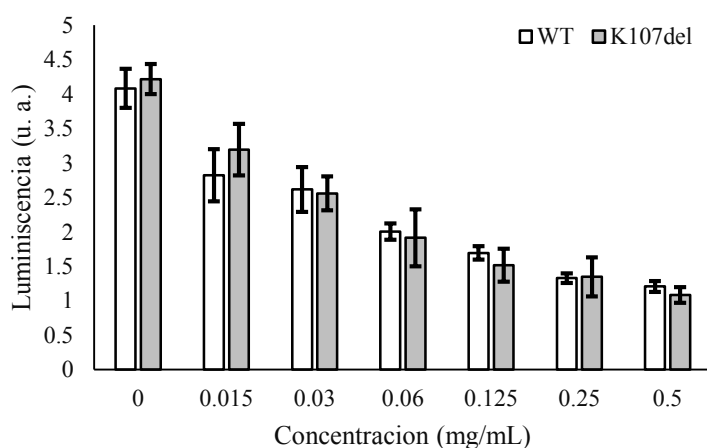
Este análisis mostrado en la figura 4.15. no evidenció diferencias notables en la capacidad para la interacción tanto de la Wt como de la K107del con cualquiera de las fracciones lipoproteicas analizadas: VLDL, LDL y HDL. A su vez, alícuotas coincidentes con los picos cromatográficos de cada fracción lipoproteica se analizaron luego mediante SDS-PAGE, confirmando el resultado observado en la cromatografía de la figura 4.15. Si bien, en este apartado se muestran los resultados de un único experimento, éste presenta coincidencias con los resultados obtenidos anteriormente (detallados a lo largo de la sección 4.2.). Al menos de manera preliminar, no se evidenciaron variaciones en la capacidad de interacción entre Wt y K107del con las lipoproteínas plasmáticas.



**Figura 4.15. Ensayos de interacción de lipoproteínas plasmáticas (plasma completo) con Wt y K107del.** **A)** Cromatogramas obtenidos al monitorear la absorbancia a 280nm luego de normalizar los valores al máximo de absorbancia. Las variantes nativas se incubaron directamente con la fracción plasmática completa en relación 1:1 (Proteínas plasmáticas:apoA-I) a 1 mg/ml final durante 15' a temperatura ambiente. La separación cromatográfica se realizó a TA utilizando tres columnas Superdex 200 en tándem, equilibrada previamente con Buffer Tris (TBS) esterilizado por filtración. El mismo buffer fue utilizado como tratamiento control. **B)** Control de calidad de las proteínas recombinantes utilizadas conteniendo el Tag de histidinas (HisTag), mediante SDS-PAGE por tinción con coomassie. **C)** Se utilizaron alícuotas correspondientes a los picos cromatográficos señalados en A) para analizar la presencia de apoA-I-HisTag en las fracciones indicadas (VLDL; LDL y HDL). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de gradiente 4-15% comerciales, por tinción con plata. Las calles "C" corresponden a muestras incubadas con TBS como control (sin proteínas recombinantes). Las calles "W" corresponden a muestras incubadas con Wt+HisTag; y las calles "K" corresponden a muestras incubadas con K107del+HisTag.

#### 4.2.10. Ensayo de unión de LDL a MOVAS

Para estudiar el efecto de la delección directamente sobre un modelo celular, se utilizó un ensayo de unión de LDL a MOVAS. Actualmente esta metodología se encuentra en proceso de validación, sin embargo, resulta útil como complemento al resto de los ensayos detallados a lo largo del apartado 4.2. Para este experimento, se fijan las células luego de estimular la producción de proteoglicanos. Sobre las monocapas fijadas se realiza una preincubación con concentraciones crecientes de ambas variantes proteicas por separado, para tratar posteriormente la monocapa con nLDL. La capacidad de inhibición de unión de las nLDL a las células se analiza mediante inmunoluminiscencia incubando con anticuerpos anti-apoB conjugados a luciferasa. Este análisis da una medida de la capacidad de inhibición de las variantes para la unión de las nLDL a las células. Como se muestra en la figura 4.16., para todas las concentraciones ensayadas, no se evidenciaron diferencias entre Wt y K107del en la inhibición de la unión de nLDL a células MOVAS.

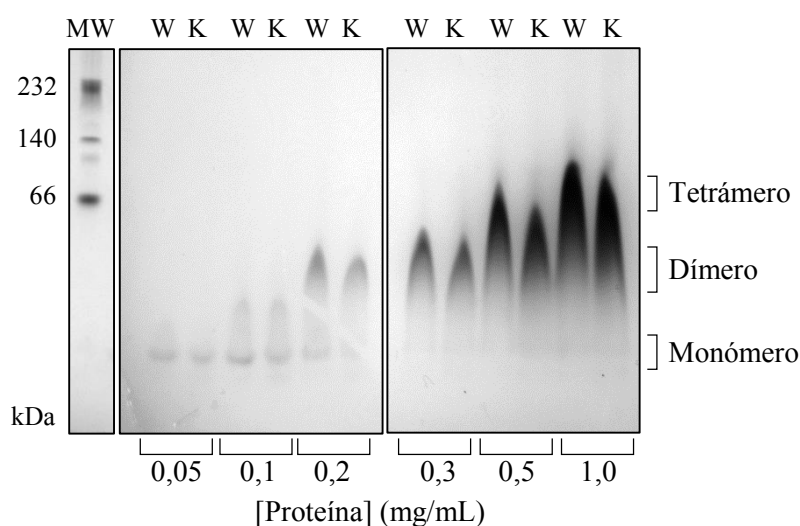


**Figura 4.16. Ensayos de unión (*binding*) de nLDL a MOVAS.** El gráfico muestra como unidades arbitrarias de luminiscencia cantidades relativas de apoB-100 sobre las monocapas celulares, tratadas previamente con las proteínas Wt y K107del a las concentraciones indicadas. Las barras muestran los valores promediados provenientes de 3 experimentos diferentes  $\pm$  el desvío estándar.

## 4.3. Estudios de biofísica estructural

### 4.3.1. Ensayos de oligomerización nativa

Con el fin de investigar si la delección de la K107 afecta al equilibrio de oligomerización de apoA-I se realizó un estudio de oligomerización comparando la Wt y la K107del en su estado nativo. Para ello se utilizaron concentraciones crecientes de ambas proteínas y mediante PAGE se analizó la presencia de oligómeros a concentraciones sub- y oligoméricas. Como se observa en la figura 4.17., Ambas variantes presentan especies oligoméricas de tamaño creciente conforme al aumento de la concentración proteica. La separación por PAGE no permite discernir con claridad las diferentes poblaciones oligoméricas, sin embargo, se puede estimar la presencia de monómeros, dímeros, y tetrámeros según sus pesos moleculares (28; 56; y 112 kDa respectivamente). Mediante este análisis y a lo largo de todas las concentraciones ensayadas no se apreciaron diferencias notables en las abundancias oligoméricas entre la Wt y la K107del nativas. Sin embargo, se puede observar una menor intensidad a la altura de los tetrámeros por la K107del, aunque esta observación no es concluyente.

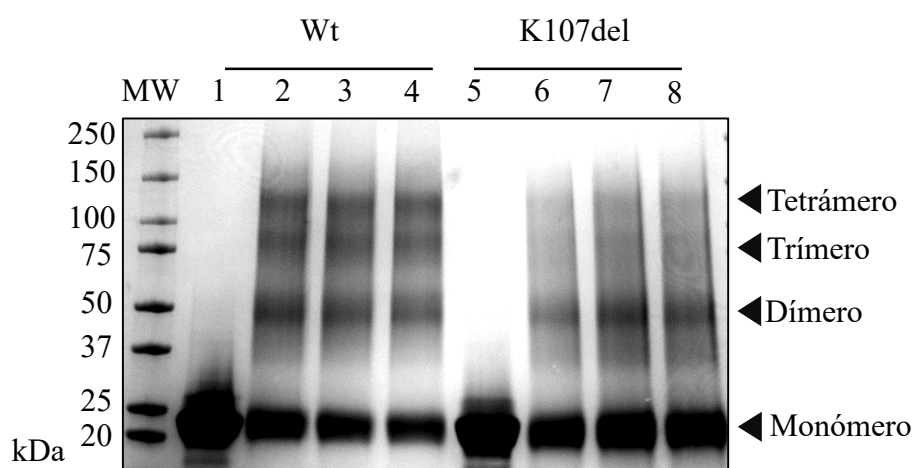


**Figura 4.17. Formación de oligómeros de Wt y K107del mediante evaluación por PAGE.** En la imagen se muestran las proteínas Wt (W) y K107del (K) en estado nativo a las concentraciones indicadas. Las proteínas se separaron en un gel en gradiente 4-15% (comercial) y se revelaron por tinción por plata. Los estados oligoméricos señalados se estimaron en base a los pesos moleculares del estándar de peso molecular (MW) señalados a la izquierda del gel.

### 4.3.2. Estudio de oligomerización de Wt y K107del mediante entrecruzamiento con BS<sup>3</sup>

Como se analizó en el apartado 4.2.3., luego de entrecruzar las proteínas a concentraciones crecientes se observó una menor capacidad para formar dímeros por parte de la K107del (figura 4.6.). En base a esos resultados se realizó una nueva serie de experimentos modificando las condiciones experimentales anteriores a fin de profundizar sobre este resultado y maximizar las condiciones de visualización. Para estos experimentos se utilizó una relación de BS<sup>3</sup>:proteína de 50:1 (radio molar) y se incrementó el tiempo de incubación a 12 horas [72]. Bajo estas condiciones se buscó estudiar directamente el equilibrio de formación de todos los oligómeros posibles para ambas variantes a una concentración de 1 mg/ml ; ya que a esta concentración se sabe que apoA-I es capaz de formar monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros [72].

Como se observa en la figura 4.18. mediante SDS-PAGE, se evidenció un entrecruzamiento exitoso para todos los estados oligoméricos mencionados; y tanto la Wt como la K107del presentaron la capacidad de formar dímeros, trímeros y tetrámeros. Sin embargo, a simple vista se puede apreciar una notable disminución en la intensidad



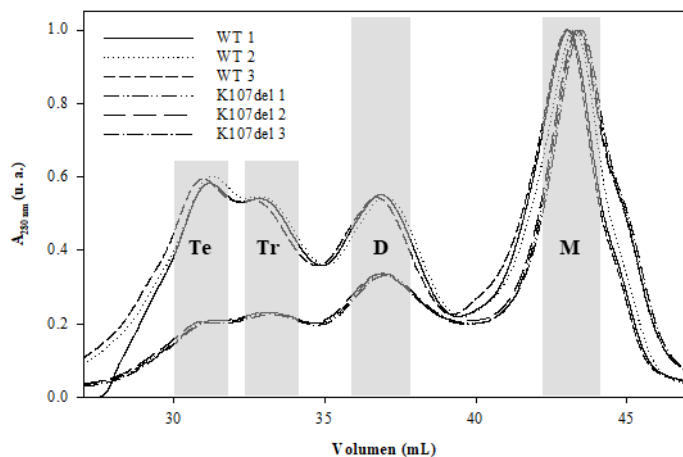
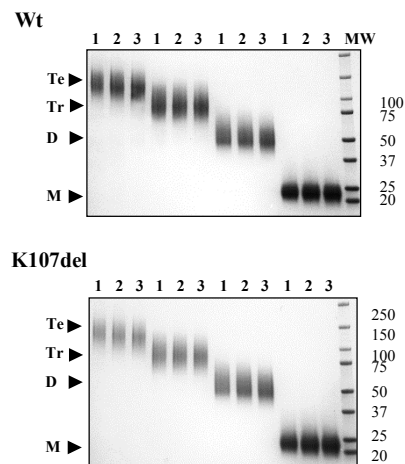
**Figura 4.18. Evaluación mediante SDS-PAGE de los estados oligoméricos para Wt y K107del entrecruzadas.** En la imagen se muestra la separación por SDS-PAGE de los oligómeros formados por Wt y K107del luego de entrecruzadas con BS<sup>3</sup> a una concentración final de 1 mg/ml utilizando un radio molar de 50:1 (BS<sup>3</sup>:proteína). Las calles 1 y 5 corresponden a controles de proteínas que no fueron entrecruzadas. Las calles 2, 3 y 4 y las calles 6, 7 y 8 representan 3 experimentos de entrecruzamiento independiente para la Wt y la K107del respectivamente. A la izquierda se muestra el estándar de peso molecular *full-range* utilizado para confirmar la identidad de los oligómeros, detallada a la derecha del gel.

de los estados triméricos y tetraméricos de la K107del. Considerando que la imagen muestra tres experimentos independientes para cada variante, estas diferencias en la intensidad resultaron características de la K107del.

En este apartado no se cuantificaron por densitometría las abundancias relativas, ya que se optó por realizar la cuantificación precisa mediante FPLC, como se detalla en el apartado siguiente.

### **4.3.3. Cuantificación comparativa de los estados oligoméricos de Wt y K107del entrecruzados mediante FPLC**

Para cuantificar con exactitud y precisión las diferencias en las abundancias oligoméricas observadas en el apartado anterior mediante SDS-PAGE, se realizó una separación por cromatografía de exclusión FPLC por el pasaje de las muestras a través de tres columnas en tándem de Superdex 200. Para inyectar las muestras, 4 mg de proteína total entrecruzada a 1 mg/ml se concentraron a un volumen final de ~350µl y luego se filtraron para remover los agregados proteicos y/o impurezas. Los cromatogramas se obtuvieron luego de normalizar la absorbancia monitoreada a 280 nm. Como se observa en el cromatograma de la figura 4.19. Wt y K107del presentan picos coincidentes al peso molecular de monómeros, dímeros, trímeros y tetrameros. Esta observación se comprobó mediante el análisis por SDS-PAGE utilizando las fracciones correspondientes a los picos visualizados en el cromatograma geles de la figura 4.19. Cabe mencionar que ninguna de las variantes presentó estados intermedios (por ejemplo, pesos equivalentes a 1,5 moléculas de apoA-I) lo cual concuerda con el equilibrio de oligomerización descrito para las cuatro poblaciones multiméricas mencionadas. En cambio, al analizar las intensidades de los cromatogramas se evidencian profundas diferencias en la abundancia relativa de los oligómeros, concordantemente con lo observado en el apartado anterior 4.3.2.

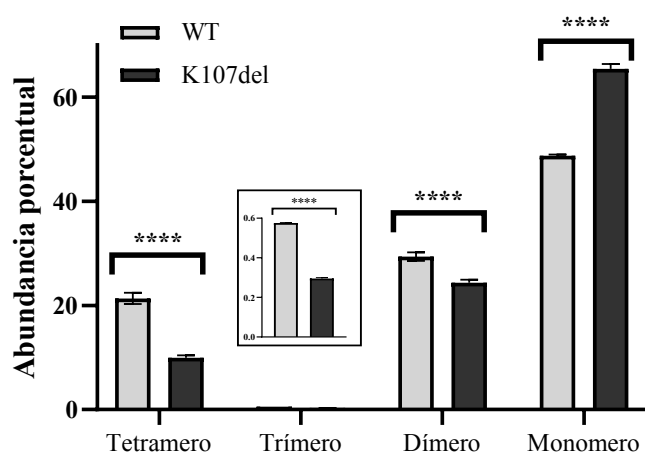
**A)****B)**

**Figura 4.19. Purificación mediante FPLC de oligómeros entrecruzados de Wt y K107del. A)**

La figura muestra los cromatogramas normalizados, provenientes de separar 4 mg de proteína entrecruzada a 1 mg/ml monitoreando la absorbancia a 280 nm. Las muestras se concentraron a 350  $\mu$ l se filtraron y se separaron en tres columnas en tándem de Superdex 200 a 4°C. El sombreado indica las fracciones correspondientes a tetrámeros “Te”, trímeros “Tr”, dímeros “D” y monómeros “M”. **B)** Las fracciones colectadas en A) se analizaron por SDS-PAGE (señalado a la izquierda de cada gel). Los gels en gradiente 4-15% se tiñeron con coomassie. En cada calle se corrió el número de réplica indicado arriba y a la izquierda se muestra el estándar de peso molecular utilizado para constatar la identidad oligomérica.

Para cuantificar esta observación se integró el área bajo la curva de los cromatogramas normalizados, correspondiente a cada oligómero. Luego se calculó la abundancia porcentual utilizando a la suma de todos los estadios para una muestra dada, como el 100%. Como se observa en la figura 4.20. todos los estadios oligoméricos presentaron diferencias significativas al comparar la Wt con la K107del. A su vez, la mayor diferencia en las abundancias oligoméricas se observó en los tetrámeros y la menor diferencia se evidenció en los trímeros como se evidencia en la tabla 4.1. La K107del presentó la menor abundancia comparativa en sus estadios triméricos y tetraméricos efecto que tiene una implicancia directa en la abundancia relativa de monómeros. Esta observación obvia se comprueba ya que aquella proteína que no se encontró formando parte de los multímeros se acumuló como monómero.





**Figura 4.20. Abundancias porcentuales comparadas de oligómeros entrecruzados Wt y K107del.** La imagen muestra las abundancias relativas de cada oligómero entrecruzado para Wt y K107del. Las abundancias se calcularon utilizando como 100%, la suma de todas las abundancias para una muestra dada. Las barras representan el promedio  $\pm$  el desvío estándar de la integración del área bajo la curva para cada oligómero, utilizando los cromatogramas mostrados en la figura 4.19. y los asteriscos cuádruples valores  $p < 0,0001$ .

<i>Abundancia oligomérica relativa (%)</i>			
Oligómero	WT	K107del	Diferencia
Tetramero	21,3 $\pm$ 0,4	9,9 $\pm$ 0,2	11,4
Trímero	0,6 $\pm$ 0,002	0,3 $\pm$ 0,005	0,3
Dímero	29,4 $\pm$ 0,3	24,4 $\pm$ 0,2	5,0
Monómero	48,7 $\pm$ 0,1	65,4 $\pm$ 0,4	16,7

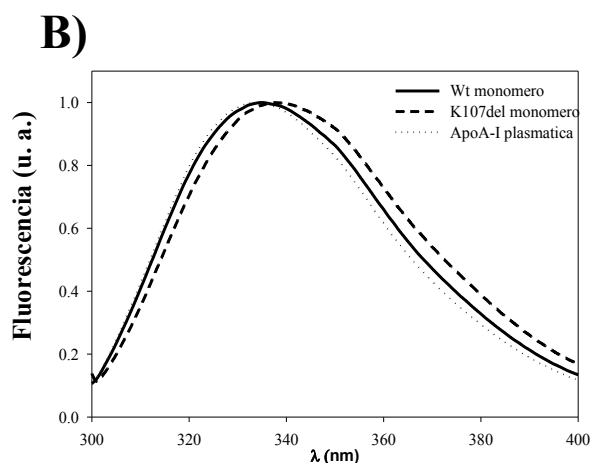
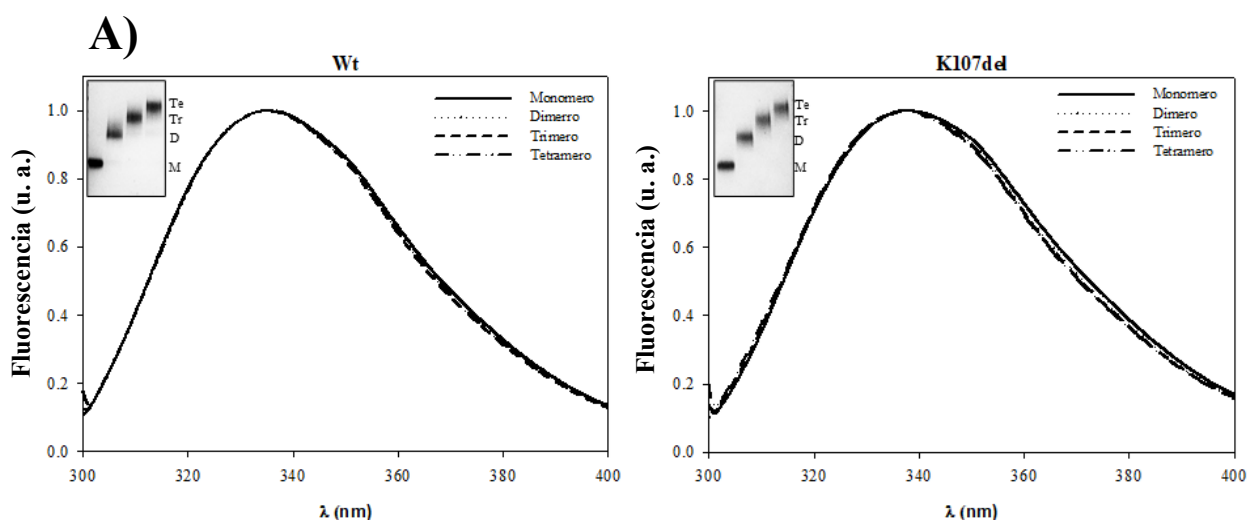
**TABLA 4.1. Abundancias porcentuales comparadas de oligómeros entrecruzados Wt y K107del.** Para confeccionar la tabla, se utilizaron los valores promediados de tres experimentos  $\pm$  el desvío estándar representados en la figura 4.20.

#### 4.3.4. Análisis estructural de oligómeros libres de lípidos por fluorescencia intrínseca

Para el estudio conformacional por fluorescencia, se utilizaron los oligómeros entrecruzados purificados de Wt y K107del obtenidos por FPLC (como se detalló en el apartado 4.3.2.). Con estas muestras, se evaluó la fluorescencia intrínseca de los triptófanos analizando la exposición al solvente de los mismos; ya que la mayor o menor exposición al solvente de los grupos indólicos genera un corrimiento espectral al rojo o al azul respectivamente (el fundamento teórico se detalló en la sección 1.9.1.).

Tomando ventaja de la presencia de los cuatro triptófanos de apoA-I, se estudió su exposición al solvente en cada oligómero entrecruzado y libre de lípidos para ambas variantes. Como se mencionó en el de la Introducción (cuadro 1.2. Reportes

bibliográficos de técnicas biofísicas e in vitro para la variante K107del), Ramella *et al.* 2012 reportaron un corrimiento neto al rojo de alrededor de 2 nm del espectro generado por la variante K107del, indicando en promedio una mayor exposición al solvente de sus triptófanos. Utilizando estos antecedentes se buscó determinar si los estados oligómeros de una y otra variante pudieran diferir estructuralmente al menos en las regiones o dominios próximos a los triptófanos. Para ello se adquirieron los espectros de emisión de todos los oligómeros entre 300 y 400 nm excitando a 295nm como se describe en Materiales y Métodos 3.9.2. Como se muestra en la figura 4.21. ningún estadio oligomérico de la Wt o de la K107del indujo corrimientos espectrales comparativamente a sus respectivos monómeros. Y, como se detalló en la sección de Resultados 4.2.3., los monómeros croslinkados no presentan corrimientos espectrales respecto a los monómeros nativos comparando cada variante (Wt/Wt+BS<sup>3</sup> o K107del/K107del+BS<sup>3</sup>). Acorde a lo mencionado anteriormente, en el caso de la K107del el corrimiento promedio fue de ~2,5 nm, en coincidencia al reportado. En la imagen 4.21.B. se observa a modo de control, los espectros de monómeros Wt y K107del nativos comparados a la apoA-I plasmática.



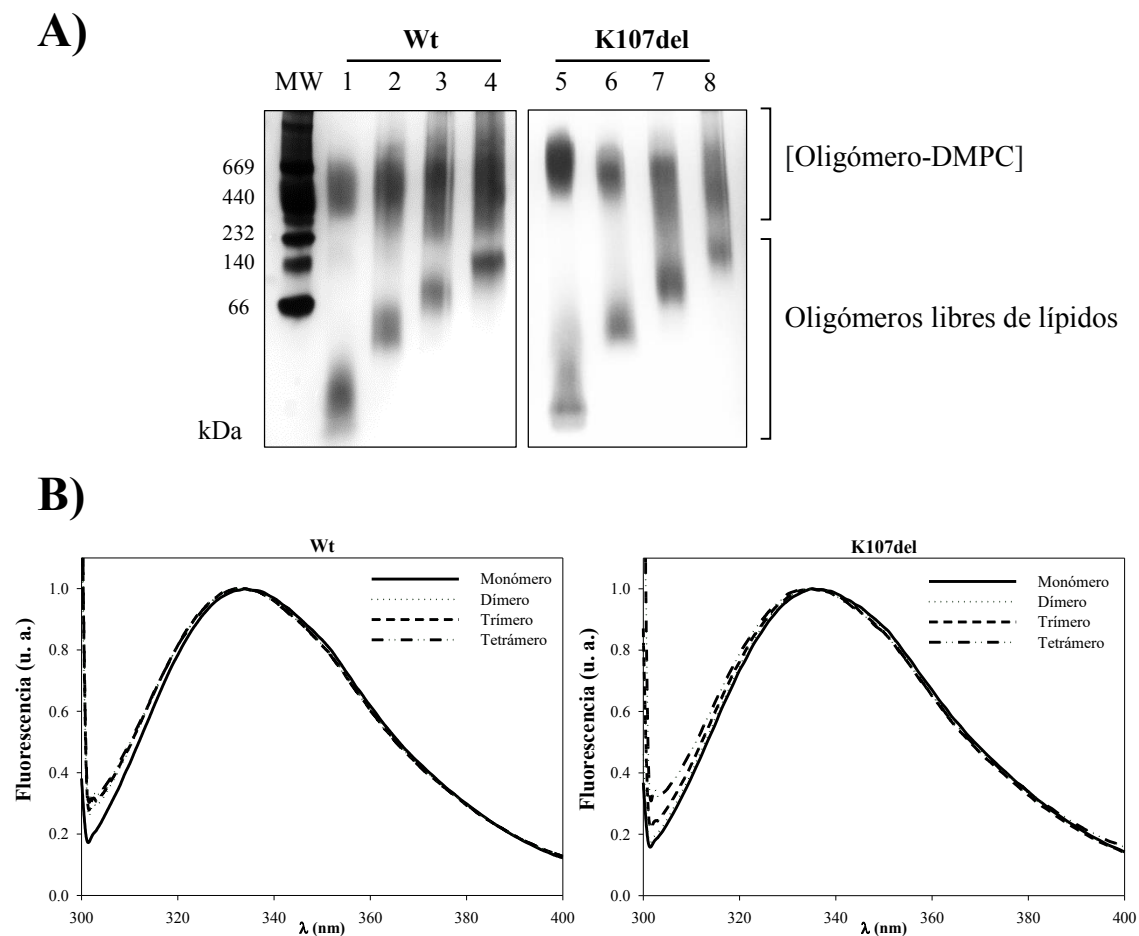
**Figura 4.21. Fluorescencia intrínseca de oligómeros entrecruzados de Wt y K107del.** A) La figura muestra los espectros de fluorescencia intrínseca normalizados por su máximo, excitando a 295 nm. Según se observa en la imagen no se detectan corrimientos significativos en ningún oligómero en cada set Wt y K107del. En los apartados insertados en cada set de espectros, se muestra la pureza según SDS-PSGE de los oligómeros utilizados en la determinación. Los geles en gradiente 4-15% se revelaron por tinción con coomassie y las muestras se obtuvieron luego de su separación por FPLC en 3 columnas en tándem de Superdex 200. B) Los espectros adquiridos como se indicó en A) muestran los corrimientos espectrales para K107del (~2,0-4,0 nm) y Wt (0-0,5 nm)

#### 4.3.5. Fluorescencia intrínseca de oligómeros entrecruzados lipidados

Para continuar con el estudio conformacional de lo oligómeros, se decidió “funcionalizar” a los mismos con DMPC. De esta serie de análisis, pueden diferenciarse resultados tanto estructurales como funcionales y en este apartado se analizarán ambos.

Manteniendo los protocolos de micelización espontánea de MLV de DMPC detallados en la sección 3.6.6. Materiales y Métodos, optimizados a 72 h y en un radio molar 145:1 (DMPC:proteína) se estudió la capacidad de todos los estados oligoméricos

entrecruzados de ambas variantes para lipidarse. Como se observa en la figura 4.22. todos los oligómeros entrecruzados en ambas variantes fueron capaces de formar complejos lipoproteicos. Aunque no se cuantificó la eficiencia con precisión, se puede observar que la capacidad de formación de complejos lipoproteicos es similar en todos los casos. A su vez se observó que dichos complejos no difieren en su movilidad electroforética, lo que indicaría un peso molecular similar para todos ellos.



**Figura 4.22. Caracterización de oligómeros entrecruzados de Wt y K107del lipidados con DMPC. A)** La imagen muestra mediante PAGE, los complejos formados luego de incubar los oligómeros entrecruzados de cada variante durante 72 h a 24°C en un radio molar de 145:1 (lípidos:proteína) a una concentración final proteica de 0,05 mg/ml. Los geles 4-15% se revelaron mediante tinción por plata y a la derecha se muestra el estándar de peso molecular utilizado. Las calles 1 y 5 muestra los complejos formados por monómeros, las calles 2 y 6 muestra los complejos formados por dímeros, las calles 3 y 7 muestra los complejos formados por trímeros y las calles 4 y 8 muestra los complejos formados por tetrameros. **B)** La figura muestra los espectros de fluorescencia intrínseca normalizados por su máximo, excitando a 295 nm. Según se observa en la imagen no se detectan corrimientos significativos en ningún complejo lipoproteico para cada set Wt y K107del. Los espectros se adquirieron utilizando las muestras caracterizadas en A) sin separación previa de los complejos lipidados y la proteína libre de lípidos.

Estos mismos complejos fueron estudiados en el fluorómetro con objeto de determinar sus máximos espectrales. Como se observa en la figura 4.22. no se evidencian diferencias en los máximos espectrales para las series de complejos de Wt o de K107del. Sin embargo, en ambas series lipidadas se observa un corrimiento al azul que varía entre 0,5-1,5 nm. Si bien este corrimiento indica una menor exposición al solvente de los triptófanos, como los oligómeros libres de lípidos no se separaron de los oligómeros lipidados previo al análisis fotométrico, las medidas constan de un promedio entre proteína libre de lípidos y la lipidada. Estas mediciones no pueden tomarse como absolutas; sin embargo, no parecieran existir diferencias en la conformación proteica de los oligómeros en su estado lipidado para cada serie oligomérica para la Wt o la K107del (al menos en las regiones cercanas a los triptófanos). Estos valores y los del apartado anterior se resumen en la Tabla 4.2.

Fluorescencia intrínseca, $\lambda$ máx. (nm) de oligómeros entrecruzados libre de lípidos y lipidados (DMPC)				
OLIGOMERO	WT		K107del	
	Libre de lípidos	+ DMPC	Libre de lípidos	+ DMPC
Tetrámero	334.5±0.7	334	337	335
Trímero	334	334	337	336
Dímero	335	333	337.5±0.7	335
Monómero	335	333	337.5±0.7	335

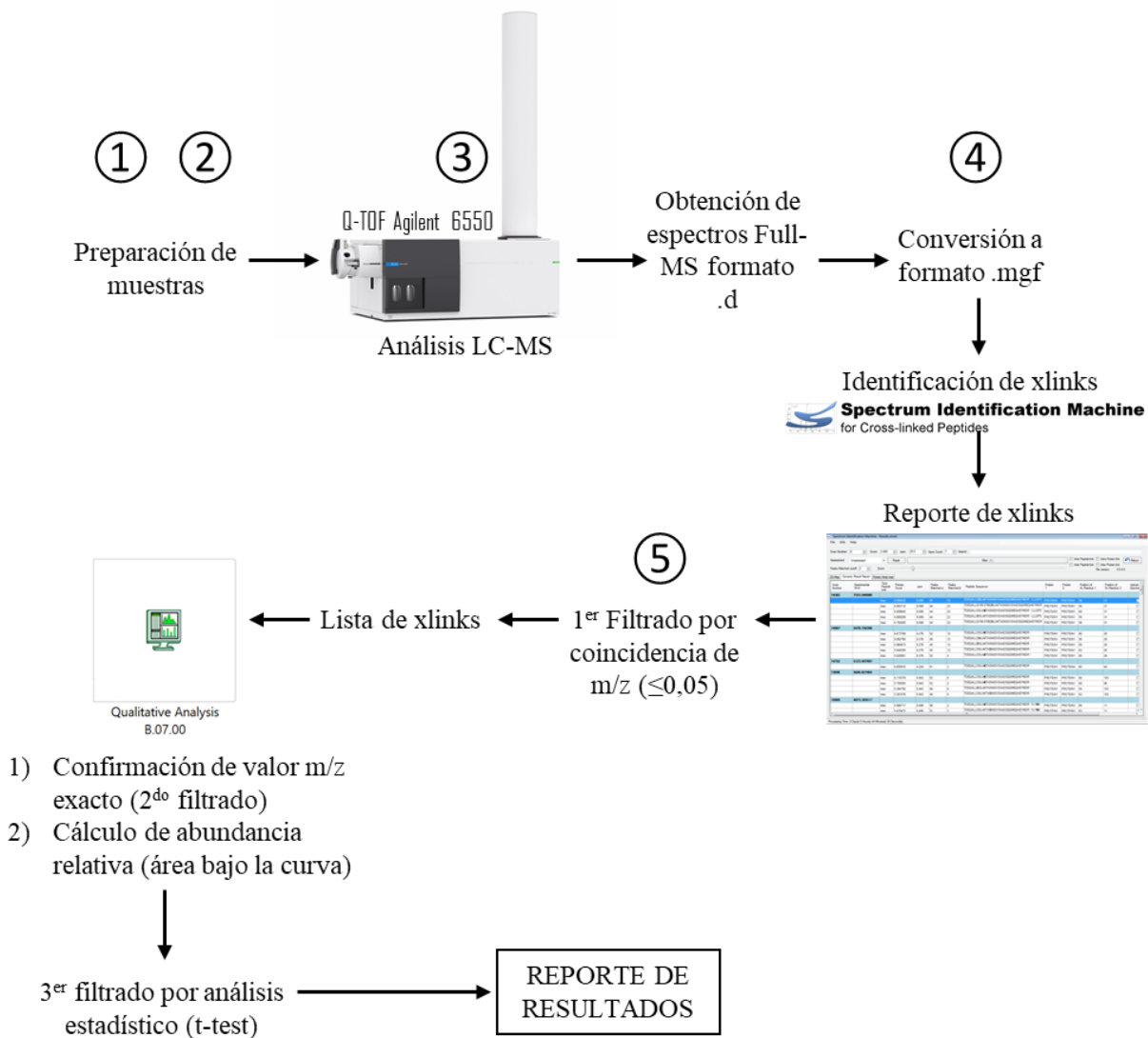
**Tabla 4.2. Máximos de fluorescencia intrínseca de oligómeros entrecruzados Wt y K107del libre de lípidos y lipidados con DMPC.** La tabla muestra los máximos de fluorescencia intrínseca obtenidos al excitar las muestras a 296 nm graficados en las imágenes 4.21. y 4.22. Los resultados numéricos reflejan el promedio  $\pm$  el desvío estándar de tres experimentos distintos.

## 4.4. Determinación de dominios interactuantes de K107del mediante espectrometría de masas

### 4.4.1. Aproximación metodológica

Este análisis se fundamentó y llevó a cabo en cinco procesos básicos mostrados en el esquema 4.2.: 1) entrecruzamiento de las proteínas de interés con BS<sup>3</sup>; 2) digestión de las mismas con tripsina; 3) análisis de los productos de digestión proteica mediante LC-MS y recolección de espectros full-MS 4) asignación de la identidad de los péptidos entrecruzados (mediante determinación de secuencia y residuos entrecruzados); 5) Confirmación de los resultados y análisis estadístico, mediante softwares específicos.

Como se detalló en la sección anterior, el BS<sup>3</sup> es capaz de entrecruzar (en inglés *crosslinking*) aminas primarias mediante sus grupos succinimida. A su vez se puede conocer, de forma teórica, el patrón de digestión posible de apoA-I (si se conoce la proteasa utilizada y el número de cortes omitidos “*misscleverages*”). De esta manera se puede combinar los péptidos teóricos entre sí considerando las uniones vía Lys-Lys o N-terminal-Lys en programas específicos. Conociendo los pesos moleculares de los péptidos y del BS<sup>3</sup>, se cuenta entonces con el punto de partida teórico, la información que se utilizará luego para identificar los péptidos entrecruzados reales (en adelante los péptidos entrecruzados serán referidos como “*xlinks*”). Esta descripción es una simplificación de los procesos llevados a cabo directamente por los algoritmos de los motores de búsqueda utilizados detallados en la sección 3.9.5. de Materiales y Métodos.



- 1) Confirmación de valor m/z exacto (2<sup>do</sup> filtrado)
- 2) Cálculo de abundancia relativa (área bajo la curva)

3<sup>er</sup> filtrado por análisis estadístico (t-test)

**Esquema 4.2. Algoritmo utilizado para la identificación de dominios interactuantes por entrecruzamiento.** En el esquema se resume el recorrido experimental (pasos 1 a 3) para la obtención de los espectros full-MS para el análisis de los péptidos entrecruzados “xlinks”. Los pasos resumidos en 4 muestran la preparación de los espectros para su análisis mediante softwares específicos. El paso 5 en adelante grafica el análisis mediante softwares y los filtros manuales que se aplicaron hasta llegar al reporte de los xlinks diferenciales con validez estadística

#### 4.4.2. Diseño experimental y puesta a punto

Para poder determinar los dominios interactuantes en la K107del se utilizó un diseño experimental comparativo a la Wt. En todos los casos se analizó las lisinas

interactuantes de las proteínas en su conformación nativa y libre de lípidos. Si bien se analizaron todos los multímeros por espectrometría de masas, a los fines de esta tesis solo se reportarán los resultados provenientes del análisis de los monómeros.

En una primera tanda de experimentos, se trabajó considerando dos protocolos distintos para la obtención de los monómeros entrecruzados (es decir, las *muestras*): 1) por entrecruzamiento fuera del equilibrio multimérico a 0,05 mg/ml (como se detalló en 3.8.1.) variando únicamente la relación de BS<sup>3</sup>:proteína a 50:1; y 2) por purificación de los monómeros mediante exclusión molecular (FPLC) de muestras entrecruzadas a 1 mg/ml (ver figura 4.19. de la sección de Resultados y el apartado 3.9.1. de Materiales y Métodos). En el primer caso se entrecruzaron las proteínas con BS<sup>3</sup> y posteriormente las muestras se concentraron a 1 mg/ml final; se chequearon por gel y se prepararon para el análisis de LC-MS. En el segundo protocolo experimental, los monómeros se purificaron de muestras con multímeros entrecruzados, como se detalló.

Ambas muestras se prepararon y analizaron por LC-MS. Se estudiaron comparativamente los resultados y no se observaron diferencias en las lisinas interactuantes entre la Wt comparada consigo misma y la K107del comparada consigo misma, independientemente del método elegido para entrecruzar los monómeros. En este apartado no se profundizará sobre estos resultados ya que se trata de controles como parte de una puesta punto metodológica. Sin embargo, los resultados preliminares confirmaron que independientemente al protocolo de entrecruzamiento no se observaron entrecruzamientos diferenciales para cada variante entre sí; pero si entre la Wt y la K107del. Es decir, la concentración a la cual se obtienen los monómeros parece no modificar su estructura, en cambio si lo hace la delección de la lisina 107. En consideración de estos controles, se optó por utilizar el protocolo de entrecruzamiento a 1 mg/ml para repetir el análisis, posteriormente, con todos los estados oligoméricos.

Cabe mencionar que, como parte de la puesta a punto metodológica, también se realizaron controles para determinar la calidad de las muestras. Algunos de ellos constaron de: 1) determinación de *scores* elevados para la identificación de Wt y K107del como “apoA-I humana” vía MASCOT, 2) el análisis de apoA-I plasmática para contrastar los espectros y como control interno luego de cada corrida con las



muestras recombinantes, 3) análisis de modificaciones postraduccionales como oxidaciones, guanidilaciones, y formilaciones sobre las proteínas Wt, K107del y apoA-I plasmática utilizando el software Scaffold 4.11.1. (Scaffold Proteome Software Company). Con esta información se estudiaron los scores para las variante Wt y K107del comparativamente a un control de apoA-I plasmática, y se analizó el nivel de modificaciones postraduccionales comparativamente a la variante plasmática considerando oxidaciones simples o dobles; guanidilaciones y formilaciones, y también se reportó el *coverage*: nivel de cobertura de la secuencia para cada proteína como porcentaje considerando al 100% los 243 aminoácidos que componen a la apoA-I, como se observa resumidamente en la tabla 4.3.

	MASCOT DATA		SCAFFOLD DATA			
	Score	Coverage	<sup>1</sup> Coverage*	<sup>1</sup> Oxidación	<sup>1</sup> Formilación	<sup>1</sup> Desaminación
ApoA-I plasmática	3273	85%	66%	M112; M148	-	-
Wt	3327	84%	76%	M112; M148	L134; T161	-
K107del	3137	82%	73%	M112; M148	-	Q216

\*el software considera también la secuencia pre-peptido

<sup>1</sup>Modificación variable

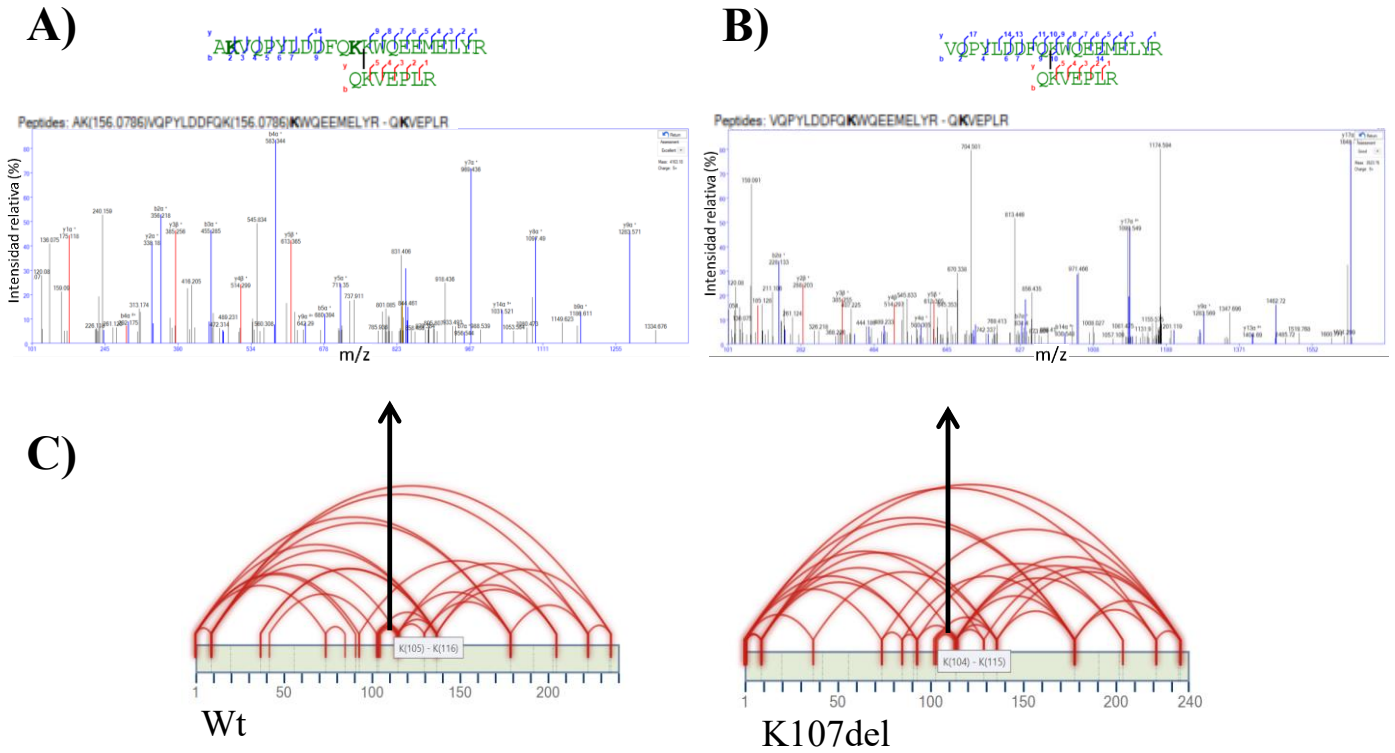
**Tabla 4.3. Scores, Coverage y PTM reportados para apoA-I plasmática, Wt y K107del.** La tabla muestra los valores de *score* y el *coverage* como porcentaje, reportados para las tres proteínas analizadas a partir de los espectros MS/MS por los softwares MASCOT y Scaffold. A su vez, se reportan las PTM variables reportadas por Scaffold.

#### 4.4.3. Análisis de péptidos entrecruzados (xlinks) utilizando SIM-XL

Como mencionó anteriormente, los monómeros de Wt y K107del entrecruzados se prepararon y analizaron por LC-MS. Una vez obtenidos los espectros full MS, la asignación de la identidad peptídica se realizó utilizando el programa *Spectrum Identification Machine for Cross-Linked Peptides* (SIM-XL). Para ello se introdujo como variables la enzima utilizada para la generación de los péptidos y el corsslinker utilizado (tripsina y BS<sup>3</sup> respectivamente en este caso). El software compara el set valores m/z teóricos de los datos de fragmentación generados *in silico* con los valores m/z de los espectros MS/MS obtenidos así, el algoritmo de SIM-XL permite realizar este análisis comparativo masivamente en muestras simples o mezclas proteicas. Los

péptidos entrecruzados que identifica el software se reportan clasificados como entrecruzamientos intra- o interpéptido con diferentes parámetros analíticos que permiten constatar la exactitud de cada péptido entrecruzado reportado. Aquí se consideraron únicamente los reportes “intrapéptido” (en referencia a los entrecruzamientos intracatenarios) sabiendo que la muestra de partida consta de monómeros únicamente, lo que permitió analizar un mayor número de xlinks.

Se configuraron los parámetros de búsqueda específicos acorde al sistema de fragmentación utilizado (ver 3.9.4. de Materiales y Métodos) y se realizó la identificación de xlinks vía SIM-XL. Una vez obtenido el reporte de los resultados, se realizó una revisión manual de los xlinks espectro por espectro para asignar el valor de confianza de los mismos manualmente (como se describe 3.9.5. de Materiales y Métodos). El criterio se estableció en base a la observación de un alto grado de fragmentación por colisión y buena señal de cada pico identificado. Para asignar el grado de confianza, se tuvieron en cuenta tanto los iones  $b$  (desde N-ter) como  $y$  (desde C-ter) para cada xlink. En la figura 4.23. se grafica el criterio utilizado, tomando un ejemplo de los xlinks que fueron considerados como *Excellent* y *Good*; para el análisis subsecuente. Una vez determinados los xlinks de alta confianza para cada muestra, se procedió a seleccionar únicamente aquellos que fuesen coincidentes para cada set de triplicados; es decir, solo los xlinks presentes en todas las muestras Wt (1, 2 y 3) fueron utilizados para continuar con el análisis y lo mismo para la K107del. Se generó entonces una única lista de xlinks de alta confianza para Wt y K107del sobre las que se aplicó un segundo filtro de confianza: se descartaron los xlinks cuyos valores de  $M+3H$  observados (experimentales) difirieron de los teóricos en un valor modular mayor a 0,05 unidades arbitrarias de  $m/z$ . Utilizando únicamente estas listas refinadas de xlinks como reportes de alta confianza se procedió a determinar los valores de área bajo la curva en los espectros full-MS utilizando el valor de  $M+3H$  y los tiempos de retención para identificar la señal específica para cada xlink.

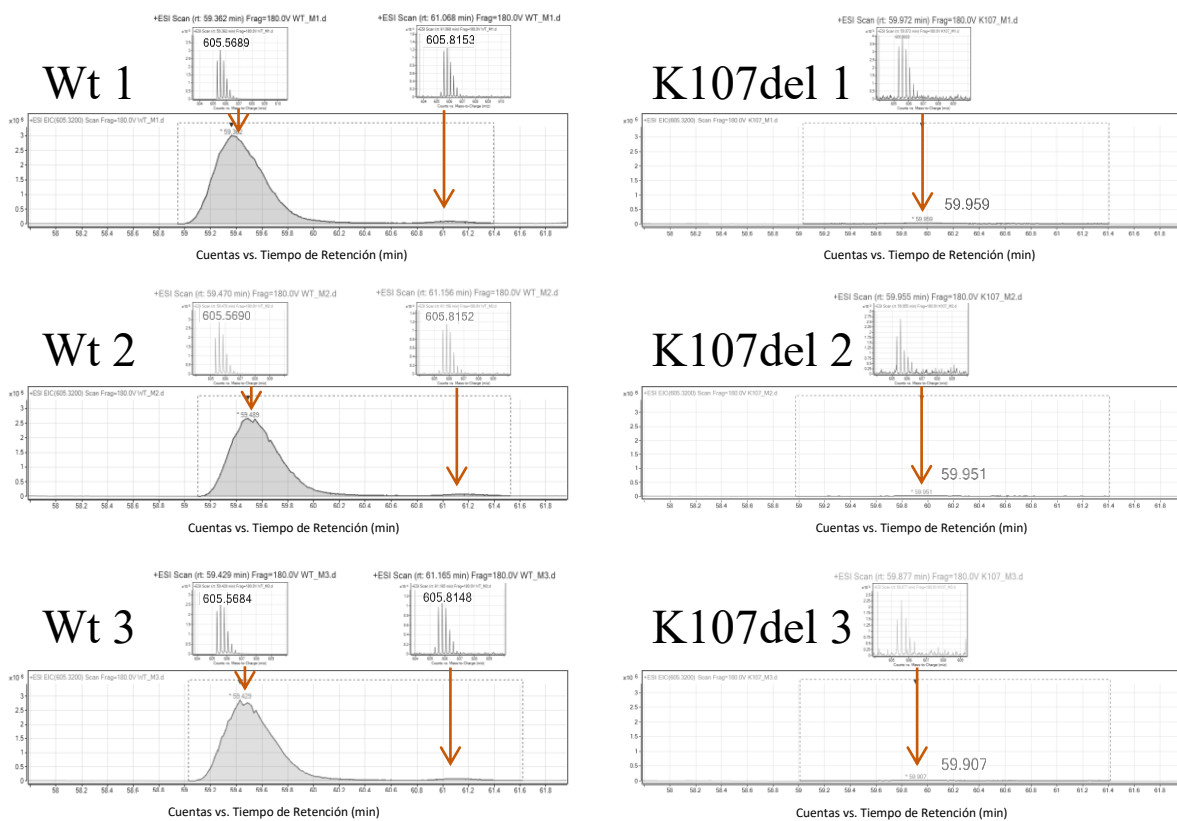


**Figura 4.23. Criterio utilizado para la asignación manual de espectros MS/MS como “Excellent” y “Good” en el software SIM-XL.** Los espectros A) y B) muestran la identificación llevada a cabo a partir de la fragmentación y b por el software SIM-XL. Estos espectros se asignaron como Excellent en A) y Good en B) debido al alto grado de fragmentación y su respectiva “buena” proporción en los picos de cada fragmento. La figura C) muestra los entrecruzamientos valorados como Good y Excellent (en rojo) como mapas 2D para Wt y K107del monoméricas. El entrecruzamiento resaltado corresponde a los espectros MS/MS mostrados en A) y B); como se indica con las flechas. Se muestran las posiciones K107-K118 para Wt y K106-K118 para la K107del (al tratarse de proteínas recombinantes se restan los 2 primeros aminoácidos escindidos por el corte con ácido fórmico).

#### 4.4.4. Determinación de abundancias relativas para los xlinks de alta confianza

Con las listas de xlinks de alta confianza obtenidas como se detalló en el apartado anterior, se calcularon las abundancias relativas mediante la integración del área bajo la curva (o bien de cada pico) en los espectros de los *extracted-ion chromatogram* (EIC) de cada xlink, utilizando el valor de m/z y los tiempos de retención reportados por SIM-XL. Como se detalló en la sección 3.9.5. de Materiales y Métodos el análisis se realizó utilizando el software MassHunter versión B.07.00 (Agilent) inspeccionando los cromatogramas EIC. Para ejemplificar el proceso, en la figura 4.24. se muestran los resultados obtenidos para el xlink K107-K118 ausente en la K107del. Posteriormente, todos los valores de área determinados para cada xlink, se normalizaron utilizando el péptido “normalizador” mostrado en la figura 4.25. de secuencia

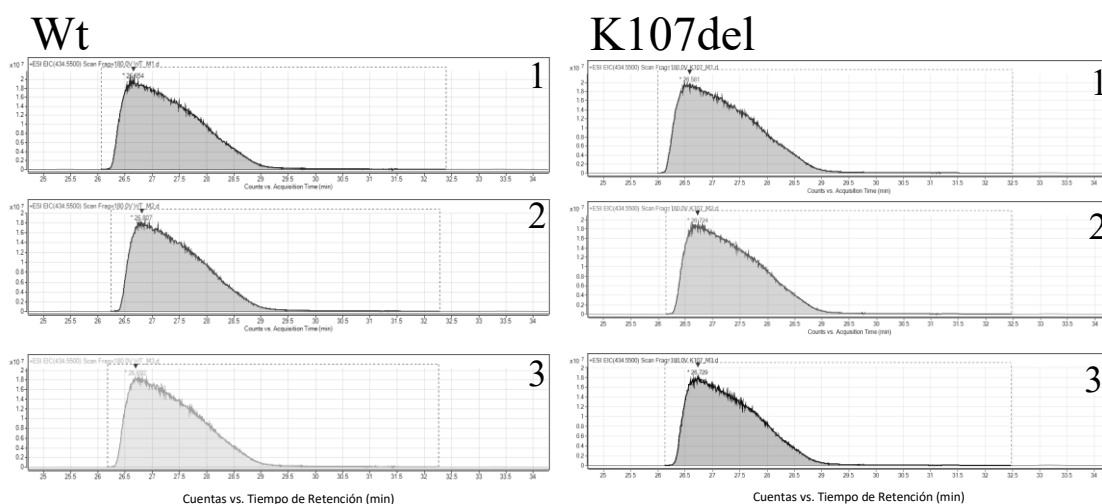
### Xlink K107-K118



**Figura 4.24. Abundancia espectral del xlink K107-K118 comparativamente en la Wt y K107del.** En la figura se muestran las abundancias sin normalizar para el xlink K(107)WQEEMELYR – QK(118)VEPLR de m/z 605,3200; tiempo de retención ~61,3 reportado por SIM-XL en los monómeros Wt. En cada cromatograma EIC se puede observar a lo largo de toda la curva señalada por el interlineado la coincidencia del valor de m/z en cada muestra. Únicamente la Wt presentó una abundancia neta medible, mientras que en el caso de K107del solo se observa la línea de base como cabe esperarse por la delección de K107. Los espectros ESI muestran los valores de m/z para los tiempos específicos señalados por las flechas en naranja. En cada cromatograma EIC se observa el escaneo de cuentas (en unidades arbitrarias, en millones) en función del tiempo de adquisición (en minutos).

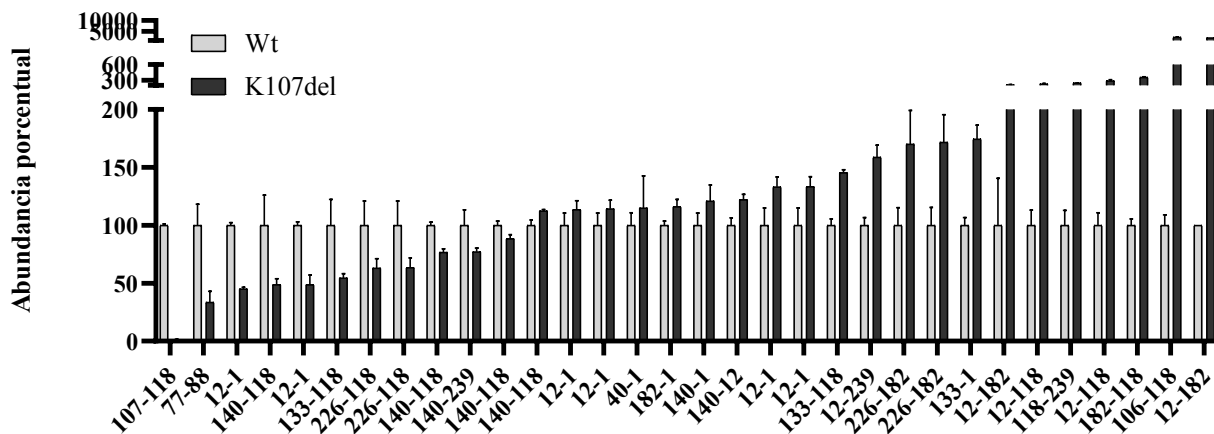
(R)THLAPYSDEL(R); con valor de  $m/z$   $M+3=434,5500$ ; y cuyo pico máximo se encontró al minuto 26,5. Cabe mencionar que este péptido debió cumplir con una serie de requisitos: 1) ser abundante en todas las muestras para evitar que pequeñas diferencias de área generen grandes cambios en los valores normalizados de los xlinks; 2) no presentar ni lisinas ni argininas en su secuencia para evitar alteraciones en su abundancia debidas al entrecruzamiento, o la tripsinización. Accesoriamente y a modo de control se utilizó otro péptido de menor abundancia espectral como normalizador: (R)EQLGPVTQEFWDNLEK(E) y los resultados fueron equivalentes.

Una vez obtenidas las abundancias relativas normalizadas, estos valores se promediaron y se analizaron estadísticamente mediante t-test corregido para análisis múltiples. Este proceso implica un aumento significativo en el grado de confianza y precisión de los xlinks reportados. En la figura 4.26. se muestran las abundancias relativas de los xlinks diferenciales estadísticamente ( $p<0,05$ ) para Wt y K107del comparados entre sí; expresados en valores porcentuales considerando el valor del xlink para la Wt como 100% para cada caso. Con estos datos se construyó la tabla 4.4. con el reporte de los xlinks hallados diferencialmente en las muestras Wt o K107del indicando, los valores de  $m/z$ , las abundancias relativas,  $M+H$  teórico y observado, la secuencia peptídica y el tiempo de retención.



**Figura 2.25. Abundancia espectral del péptido normalizador THLAPYSDEL(R).** En la figura se visualiza el pico cromatográfico EIC del péptido (R)THLAPYSDEL(R); con valor de  $m/z$   $M+3=434,5500$ ; con pico máximo al minuto 26,5; extraído de la búsqueda manual en MassHunter. Se integró el área bajo la curva para cada muestra y se utilizó para normalizar las abundancias de xlinks. No se observan diferencias notables para cada muestra. La misma escala fue utilizada en todos los gráficos. Cada triplicado Wt y K107del se agrupa verticalmente y el número de triplicado se indica en cada espectro.

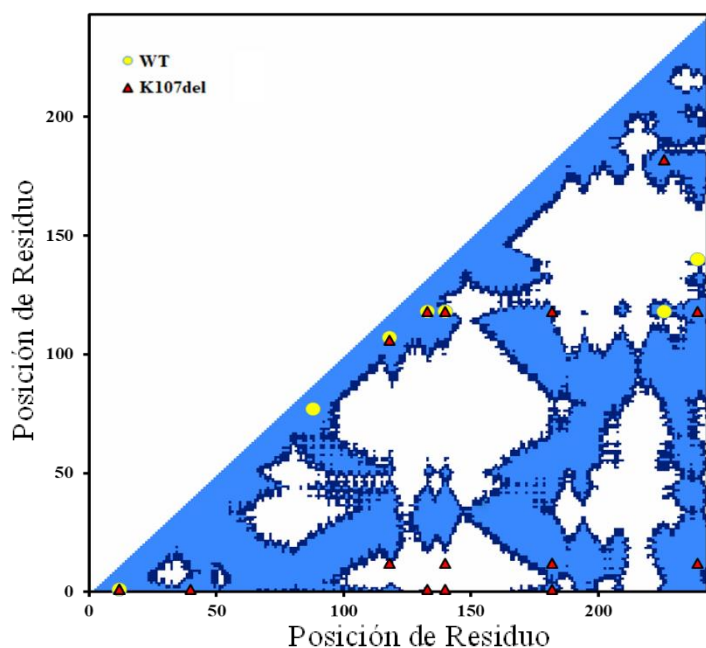
Por último, estos datos se utilizaron para construir el mapa cercanía sobre el gráfico de contactos observado en la figura 4.27. Cabe mencionar que puede darse el caso de encontrar xlinks más abundantes en la Wt y en la K107del a la misma vez. Aunque podría parecer contradictorio, este fenómeno puede darse gracias a diferencias en los valores de m/z ocasionadas a PTMs (como por ejemplo a oxidaciones) o bien patrones de tripsinización diferenciales entre las variantes. Estas posibilidades se discuten en la sección 5.3. de la discusión: “Influencia de la delección de K107 en la estructura terciaria”.



**Figura 4.26. Gráfico de abundancias porcentuales de lisinas entrecruzadas para Wt y K107del significativas estadísticamente.** El gráfico muestra las abundancias porcentuales referidas a la Wt como 100% para las lisinas entrecruzadas indicadas en las abscisas. Las barras muestran el promedio de tres experimentos independientes ± el desvío estándar. Los quiebres en el eje y no representa cambios en la escala.

En	Reportado por S.D.M-XL					Secuencia peptídica	ABSOLUTO				Porcentual			
	m/z	TR (min)	Experimental	Teórico M+H	Posición real de K		WT	S'Dv	K107del	Media area	S'Dv	WT	K107del	S'Dv
			M+H									Media area	Media area	
1) WT	517.28	92.31	2582.39	2582.39	12-1	VKDLATVYVDVVK - PPOSPWDR	0.00072	0.00002	0.00035	0.00006	100.0	3.0	48.8	8.3
2) WT	555.47	80.03	3327.80	3327.80	140-118	<b>QK</b> (156.0786)LHELQEKLSPLGGEEMR - QKVEPLR	0.00242	0.00009	0.00215	0.00008	100.0	3.6	88.5	3.4
4) WT	605.32	61.33	2418.24	2418.25	107-118	KWQEEEMELVYR - QKVEPLR	0.04587	0.00051	0.00061	0.00016	100.0	1.1	1.3	0.4
4) WT	666.36	79.42	3327.79	3327.80	133-118	<b>QKLHELQEK</b> (156.0786)LSPLGGEEMR - QKVEPLR	0.02209	0.00123	0.03211	0.00055	100.0	5.6	145.4	2.5
5) WT	666.36	80.31	3327.79	3327.80	140-118	<b>QK</b> (156.0786)LHELQEKLSPLGGEEMR - QKVEPLR	0.10804	0.00297	0.08301	0.00325	100.0	2.7	76.8	3.0
6) WT	669.56	75.64	3343.76	3343.79	140-118	<b>QK</b> (156.0786)LHELQEKLSPLGGEEM(15.9949)R - QKVEPLR	0.00422	0.00020	0.00475	0.00004	100.0	4.7	112.5	1.0
7) WT	759.73	58.18	2277.16	2277.16	182-1	LEALKENGGAR - PPOSPWDR	0.00092	0.00004	0.00107	0.00006	100.0	3.8	116.2	6.2
8) WT	766.16	80.42	3061.61	3061.62	140-239	<b>QK</b> (156.0786)LHELQEKLSPLGGEEMR - KLNITQ	0.01161	0.00154	0.00897	0.00036	100.0	13.3	77.2	3.1
9) WT	789.17	104.23	3153.65	3153.65	12-1	VKDLATVYVDVVK(156.0786)DSGR - PPOSPWDR	0.02500	0.00266	0.02840	0.00193	100.0	10.6	113.6	7.7
10) WT	789.17	135.68	3153.65	3153.65	12-1	VKDLATVYVDVVK(156.0786)DSGR - PPOSPWDR	0.00057	0.00009	0.00076	0.00005	100.0	15.1	133.4	8.5
11) WT	837.25	80.54	4182.23	4182.22	133-118	<b>QKLHELQEK</b> (156.0786)LSPLGGEEMR - QKVEPLRAELQEGAR	0.01866	0.00417	0.01017	0.00070	100.0	22.3	54.5	3.7
12) WT	860.94	91.22	3440.75	3440.75	140-1	<b>QK</b> (156.0786)LHELQEKLSPLGGEEMR - PPOSPWDR	0.00152	0.00016	0.00184	0.00021	100.0	10.6	120.9	13.9
13) WT	861.47	92.90	2582.38	2582.39	12-1	VKDLATVYVDVVK - PPOSPWDR	0.20903	0.00485	0.09444	0.00277	100.0	2.3	45.2	1.3
14) WT	902.00	123.71	3604.98	3604.99	226-118	<b>QGLLPVLESFKV</b> SFLSALAEETK - QKVEPLR	0.00379	0.00079	0.00239	0.00030	100.0	20.9	63.2	8.0
15) WT	974.03	123.73	3893.10	3893.10	226-182	<b>QGLLPVLESFKV</b> SFLSALAEETK - LEALKENGAR	0.00017	0.00003	0.00030	0.00004	100.0	15.5	171.7	23.8
16) WT	1023.50	123.13	4090.99	4090.98	77-88	<b>EQLGPV</b> TQEFWDNLEKETEGLR - QEN\$KDLEEVK	0.00163	0.00030	0.00054	0.00015	100.0	18.2	33.5	9.5
17) K107del	537.31	33.88	1609.93	1609.93	118-239	<b>QKVEPLR</b> - KLNITQ	0.00180	0.00023	0.00444	0.00007	100.0	12.9	247.1	3.7
18) K107del	541.81	42.63	2164.21	2164.21	182-118	LEALKENGAR - QKVEPLR	0.00061	0.00003	0.00216	0.00008	100.0	5.5	355.8	13.3
19) K107del	618.11	78.19	2469.43	2469.43	12-118	VKDLATVYVDVVK - QKVEPLR	0.00103	0.00014	0.00235	0.00010	100.0	13.1	228.7	9.9
20) K107del	690.14	78.56	2757.53	2757.54	12-182	VKDLATVYVDVVK - LEALKENGAR	0.00053	0.00022	0.00112	0.00004	100.0	40.6	210.8	6.6
21) K107del	697.88	81.34	4182.24	4182.22	140-118	<b>QK</b> (156.0786)LHELQEKLSPLGGEEMR - QKVEPLRAELQEGAR	0.00950	0.00247	0.00463	0.00047	100.0	26.0	48.8	5.0
22) K107del	735.09	78.07	2203.26	2203.26	12-239	VKDLATVYVDVVK - KLNITQ	0.00068	0.00005	0.00108	0.00007	100.0	6.8	158.8	10.3
23) K107del	760.93	91.70	3040.70	3040.69	12-118	VKDLATVYVDVVK(156.0786)DSGR - QKVEPLR	0.00062	0.00007	0.00180	0.00012	100.0	10.8	290.3	18.6
24) K107del	789.17	106.46	3153.65	3153.65	12-1	VKDLATVYVDVVK(156.0786)DSGR - PPOSPWDR	0.02510	0.00267	0.02868	0.00188	100.0	10.7	114.2	7.5
25) K107del	789.17	136.14	3153.65	3153.65	12-1	VKDLATVYVDVVK(156.0786)DSGR - PPOSPWDR	0.00057	0.00009	0.00076	0.00005	100.0	15.1	133.3	8.4
26) K107del	832.95	91.77	3328.77	3328.80	12-182	VKDLATVYVDVVK(156.0786)DSGR - LEALKENGAR	No Area	No Area	0.00098	0.00013	Ausente	Presente		
27) K107del	860.94	91.62	3440.74	3440.75	133-1	<b>QKLHELQEK</b> (156.0786)LSPLGGEEMR - PPOSPWDR	0.00200	0.00013	0.00349	0.00024	100.0	6.7	174.4	12.2
28) K107del	899.29	109.34	4492.40	4492.39	140-12	<b>QK</b> (156.0786)LHELQEKLSPLGGEEMR - VKDLATVYVDVVK(156.0786)DSGR	0.00049	0.00003	0.00059	0.00002	100.0	6.4	122.1	4.7
29) K107del	902.00	123.73	3604.99	3604.99	226-118	<b>QGLLPVLESFKV</b> SFLSALAEETK - QKVEPLR	0.00378	0.00079	0.00241	0.00031	100.0	21.0	63.6	8.2
30) K107del	970.50	98.78	3878.96	3878.97	106-118	<b>AK</b> (156.0786)VQPYLDDQKRWQEEEMELVYR - QKVEPLR	0.00014	0.00001	0.00309	0.00017	100.0	9.0	2206.7	124.9
31) K107del	974.03	123.73	3893.10	3893.10	226-182	<b>QGLLPVLESFKV</b> SFLSALAEETK - LEALKENGAR	0.00255	0.00039	0.00434	0.00074	100.0	15.2	170.1	29.1
32) K107del	1039.53	88.62	3116.58	3116.57	40-1	DVVSQFEGSALGKQLNLK - PPOSPWDR	0.00014	0.00002	0.00016	0.00004	100.0	10.9	114.9	27.7

**Tabla 4.4. Xlinks reportados con abundancias diferenciales entre Wt y K107del estadísticamente significativos.** La tabla muestra todos los xlinks que se validaron estadísticamente. En la tabla se indican los valores de m/z, la secuencia peptídica del fragmento tripsinizado y en negrita las lisinas (K) entrecruzadas que se indican en la columna de “posición real de K” en el caso de la posición 1 se considera el extremo N-ter. A la derecha se tabularon los valores absolutos y relativos a la Wt como porcentuales. Los valores porcentuales se utilizaron para construir el gráfico 4.26.



**Figura 4.27. Lisinas interactuantes para monómeros Wt y K107del.** El gráfico muestra las lisinas interactuantes reportadas para los monómeros de Wt (círculos amarillos) y K107del (triángulos rojos), sobre un mapa de distancias de  $C\alpha \leq 23 \text{ \AA}$  (en celeste), obtenido por simulación. El número de residuo 1-243 se muestra en cada eje. En azul oscuro se representa residuos dentro de  $28 \text{ \AA}$  de distancia (límite máximo para distancias entre  $C\alpha$  por entrecruzamiento con BS<sup>3</sup>). La línea diagonal divide el gráfico para los xlinks intramoleculares (a la derecha y debajo de la bisección).

## **4.5. Estudios proteómicos y biocelulares**

### **4.5.1. Puesta a punto para la identificación de proteínas de extractos totales de macrófagos humanos THP-1 utilizando tecnología Orbitrap**

En primera instancia se buscó comprobar que la metodología a utilizar para el estudio celular sea compatible con el análisis mediante espectrometría orbitrap. Para ello se realizó la puesta a punto con el objetivo de determinar la calidad y cantidad de las muestras, necesaria para asegurar un análisis adecuado.

La elección del protocolo de extracción proteica se tuvo en consideración: 1) la necesidad de la obtención de un extracto proteico sin contaminantes lipídicos ni proteicos (provenientes del SFB); 2) la eficiencia del método, para obtener las cantidades de proteína total necesarias para el análisis; 3) la obtención de proteínas de todas las locaciones subcelulares posibles. Bajo estas condiciones se seleccionó el método de extracción con *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) y se realizaron los extractos celulares de macrófagos THP-1 como se indica en 3.4.5. de la sección Materiales y Métodos. Para la puesta a punto experimental, la monocapa de macrófagos se lavó tres veces con PBS estéril a 37°C y se incubó únicamente con RPMI sin SFB (ss). Alrededor de 5,5-6,0 millones de células se lisaron con 1ml de buffer RIPA, del cual se obtuvo ~0,5mg de proteína total en forma de un pellet deshidratado. Las proteínas se prepararon para el estudio espectrométrico y se analizaron en el espectrómetro orbitrap como se describe en la sección 3.5. de Materiales y Métodos. Es importante destacar que el protocolo de extracción se modificó acorde a las recomendaciones del servicio de espectrometría de masas con pasos adicionales de reducción y subsecuente carbamilación; junto con el lavado del pellet utilizando acetona a -20°C para remover restos de lípidos y/o detergentes. La asignación de la identidad proteica se realizó utilizando el software Proteome Discoverer y en este caso no se analizaron las abundancias relativas de las proteínas debido a que se estudió una única muestra (sin réplicas experimentales).



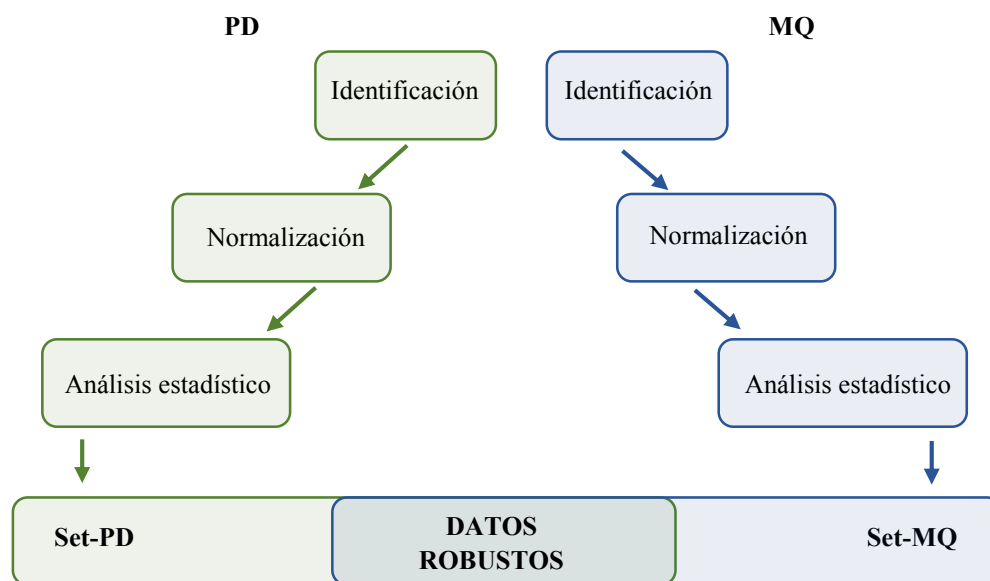
Como se puede observar en la Tabla 4.5. ingresando al siguiente enlace: <https://bit.ly/2ZWWZGL>, el resultado fue promisorio, habiéndose identificado 2646 proteínas con al menos 2 péptidos de alta confianza. Para generar el informe el programa asigna un nivel de confianza “*High*”, “*Medium*” y “*Low*” a los péptidos detectados basándose en el *false discovery rate* (FDR). Únicamente se informarán aquellas proteínas identificadas mediante dos o más péptidos únicos identificados con niveles de confianza *High*. En la Tabla 4.5. se detallan los parámetros de *Accession* que muestra el identificador único asignado a la proteína mediante la base de datos utilizada para generar el informe (Uniprot en este caso), *Description* que proporciona el nombre de la proteína exclusiva del identificador que aparece en la columna “*Accession*”, *Score* que muestra la puntuación de proteína (como la suma de las puntuaciones de los péptidos individuales), *Coverage* que muestra el porcentaje de la secuencia de la proteína cubierto por los péptidos identificados; # *Unique Peptides* que muestra el número de secuencias de péptido únicas a un grupo de proteínas que incluyen esta secuencia peptídica (en algunos casos se pueden determinar cómo péptidos únicos secuencias de al menos siete aminoácidos que pertenecen inequívoca y únicamente a una proteína particular).

#### **4.5.2. Identificación de proteínas totales en extractos provenientes de células tratadas con Wt y K107del.**

Como se refiere en el apartado anterior, se calibró exitosamente a los sistemas de extracción proteica y el análisis LC-MS reflejando un número muy elevado de proteínas identificadas. Con este resultado se procedió a realizar los experimentos con proteínas recombinantes, utilizando el mismo sistema de extracción proteica.

Como se describió en la sección 3.5.3. de Materiales y Métodos, se ensayaron tres condiciones experimentales contando con triplicados experimentales en cada una. El grupo control (Ctrol) conformado por los tres tratamientos independientes con RPMI (ss), el grupo “Wt” conformado por los tres tratamientos independientes con RPMI+Wt 30 µg/ml y el grupo “K107del” conformado por los tres tratamientos independientes

con RPMI+K107 del 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las proteínas totales se extrajeron como se indicó, y el análisis LC-MS fue llevado a cabo por el CEQUIBIEM configurando los parámetros analíticos de espectrómetro como se detalla en 3.5.1. Una vez obtenidos los espectros MS/MS crudos en formato .raw, se procedió a la asignación de identidad peptídica en un esquema bipartito (esquema 4.3.) utilizando el software Proteome Discoverer (PD) operado por el CEQUIBIEM; y utilizando simultáneamente el software MaxQuant (MQ) (operado bajo la supervisión del Dr. Sebastián A. Trejo, especializado en espectrometría de masas). El objetivo de realizar el mismo análisis utilizando dos softwares distintos fue *robustecer* los resultados para evitar falsos positivos (o falsos negativos). El proceso de robustecimiento detallado en 3.5.3. se basa en que ambos softwares utilizan recorridos algorítmicos diferentes lo que podría repercutir en reportes distintos de abundancias proteicas, según el software usado.



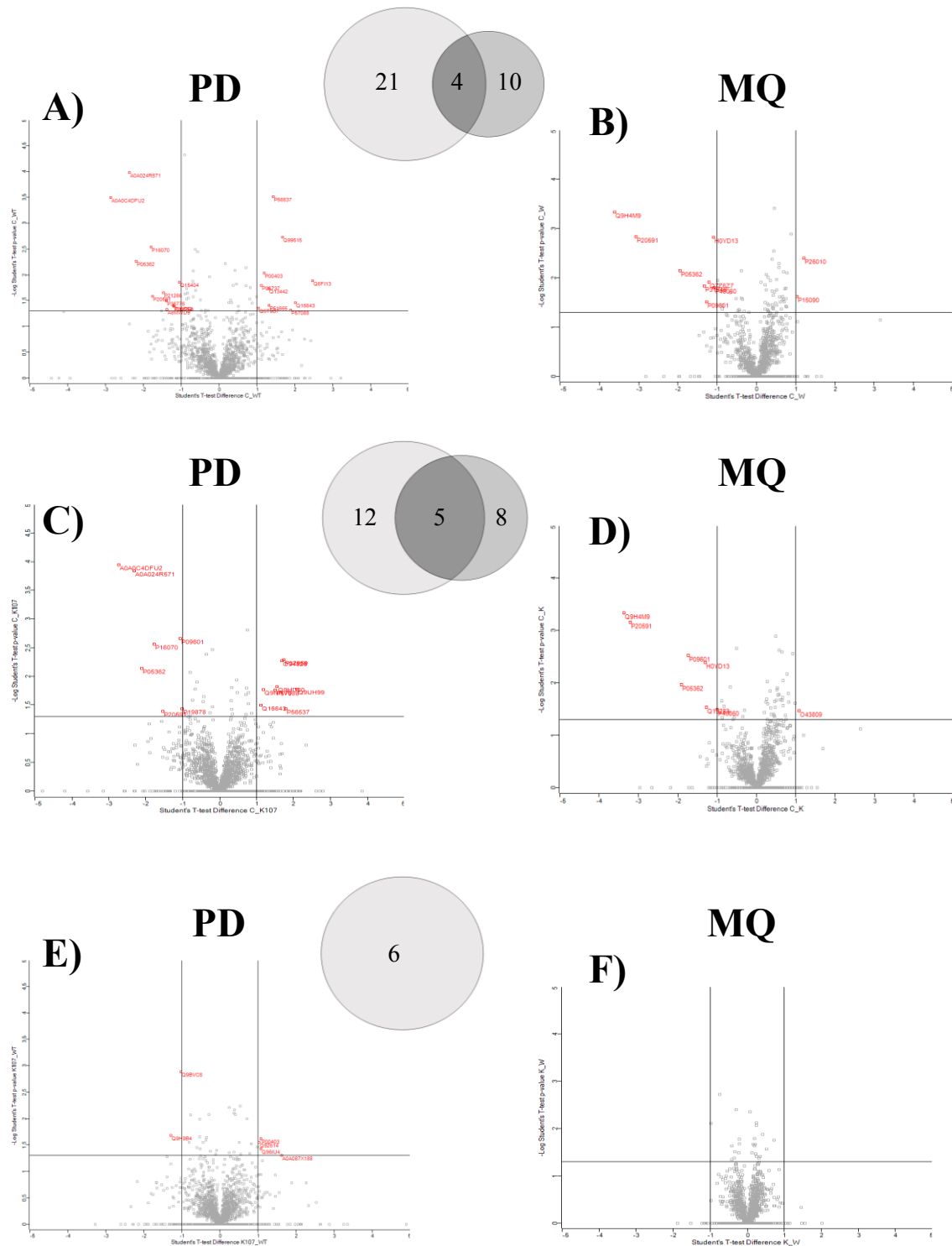
**Esquema 4.3. Proceso de robustecimiento para proteínas diferencialmente expresadas a partir del tratamiento con proteínas recombinantes.** El esquema resume los pasos llevados a cabo para generar los reportes de proteínas diferencialmente expresadas con significancia estadística y coincidentes para el software PD y MQ. La identificación de todas las proteínas presentes en cada tratamiento se llevó a cabo mediante PD y MQ que a su vez permitió la cuantificación del área bajo la curva de cada espectro asociado a cada proteína. Posteriormente las áreas relativas se normalizaron y compararon estadísticamente mediante t-test de dos muestras. Los resultados repostados en base a la identificación llevada a cabo para cada software se contrastaron y solo las proteínas diferencialmente expresadas, estadísticamente significativas coincidentes para ambos softwares se utilizaron para los pasos posteriores del estudio

Las proteínas identificadas por ambos softwares pueden visualizarse en la Tabla 4.6. “Lista de proteínas y áreas relativas identificadas por PD” entrando al siguiente enlace: <https://bit.ly/363Czj3>; y la Tabla 4.7. “Lista de proteínas y áreas relativas identificadas por MQ” entrando al siguiente enlace: <https://bit.ly/3j4SLnI>. En las tablas se detallan algunos parámetros de utilidad, referenciados en la sección ( 4.5.1. Puesta a punto para la identificación de proteínas de extractos totales de macrófagos humanos THP-1 utilizando tecnología Orbitrap: la identidad de cada proteína *identificada* mediante el *Accession* para Uniprot (éstos corresponden a la base de datos 2016, por lo que podrían haber sufrido modificaciones en su denominación actual); en *Description* que corresponde al nombre de la proteína; el *Coverge* que corresponde al peso molecular en kDa sin considerar PTMs, el valor de área normalizado de cada proteína en cada muestra y el *Coverage Sequest HT (%)* que presenta una medida de confianza calculada sumando los scores de los péptidos identificados individualmente, mayores valores representan identificaciones más fiables (el nombre se debe al motor de búsqueda que utiliza el software).

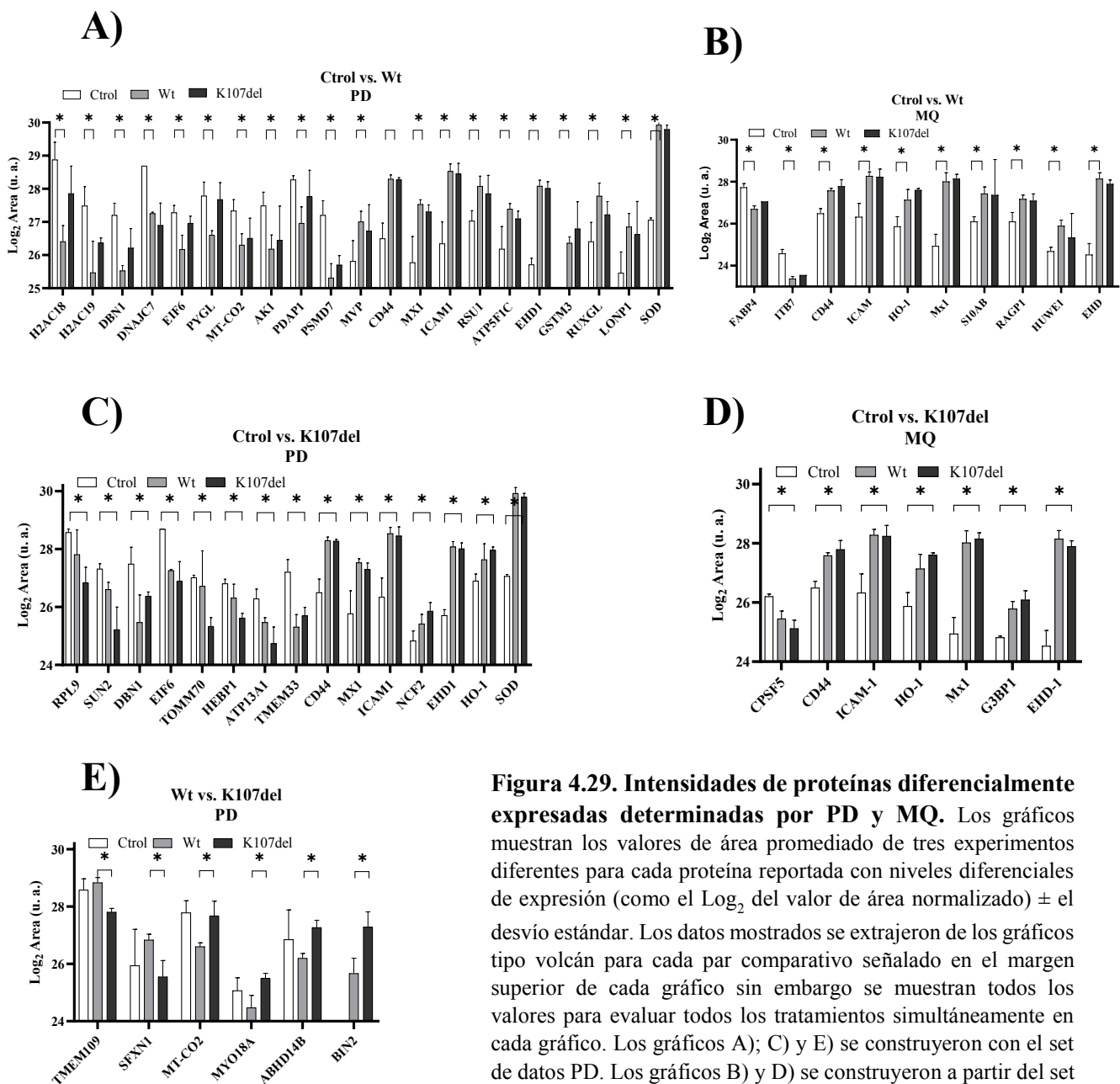
### **4.5.3. Análisis comparativo por t-test sobre los niveles de expresión diferenciales de proteínas en células tratadas con Wt y K107del**

Una vez confeccionadas las listas del apartado anterior se determinaron los niveles diferenciales de expresión en cualquiera de los tres tratamientos comparándolos entre sí (Wt vs. Ctrol; K107del vs. Ctrol; Wt vs. K107del). Para ello se cotejaron las abundancias relativas de cada proteína mediante el t-test de 2 muestras que analiza los valores de abundancia como el promedio de los triplicados, y el valor *p* para cada comparación (sobre los valores de área de una proteína puntual entre los dos tratamientos comparados). La estadística se realizó procesando los datos en el software Perseus como se detalló en la sección 3.5.3. (este software permite el análisis estadístico de datos ómicos y consecuente confección de gráficos, en una interfaz sencilla). En primer lugar, los datos de abundancia se transformaron matemáticamente aplicando el

Log<sub>2</sub>, para reducir el rango de dispersión numérica. Luego datos provenientes de los triplicados de cada tratamiento ensayado se agrupan en *grupos*: Ctol, Wt y K107del. Este proceso permitió el análisis comparativo de los tratamientos mediante el análisis estadístico de los *grupos* al contrastar los resultados de dos tratamientos simultáneamente. Estos análisis se muestran en los gráficos de tipo volcán, que permiten un acceso visual rápido a los valores diferenciales de expresión proteica que sean estadísticamente significativos sobre el par de tratamientos comparados (Ctol/Wt; Ctol/K107del o Wt/K107del). En la figura 4.28. se muestran los gráficos volcán generados para cada par comparativo mencionado, utilizando los resultados de identificación proteica obtenidos independientemente por PD o MQ. Cabe recordar que en los cuadrantes superiores derecho e izquierdo agrupan las proteínas que como mínimo doblen (o reduzcan en dos veces) su valor de área medio respecto al tratamiento con la que se la compare, considerando niveles de significancia estadística de  $p \leq 0,05$ . La confección de los gráficos volcán y el proceso de análisis estadístico se describe en mayor detalle en la sección 3.5.3. De las proteínas reportadas en los cuadrantes superiores derecho e izquierdo en los gráficos de tipo volcán se extrajeron los valores promediados de área ya transformados (Log<sub>2</sub>) con su respectivo desvío estándar y se utilizaron para construir la figura 4.29. donde se pueden visualizar las proteínas diferencialmente expresadas para cualquiera de los tres tratamientos, agrupadas en sets de datos para PD y MQ. Los nombres de las proteínas junto con su descripción y su código de identificación (*accession*) de Uniprot se detallan en la tabla mostrada abajo. En base a la identificación de las proteínas diferenciales para cada par de tratamientos comparados se continuó con el proceso de *robustecimiento* de datos. Este paso constó en aumentar el nivel de confianza de las proteínas expresadas diferencialmente para seleccionar únicamente las mejores candidatas. Para ello se contrastaron las proteínas reportadas tanto del set PD como del set MQ para cada par comparativo dado (Ctol/Wt; Ctol/K107del; Wt/K107del) y se seleccionaron únicamente las proteínas diferenciales coincidentes para PD y MQ. Es decir, se seleccionaron únicamente las proteínas diferenciales que en ambos softwares cumplieren con los cánones estadísticos. En la figura 4.30. se detallan todas las proteínas robustas reportadas considerando los tres pares comparativos posibles y sus niveles de expresión determinados en cada software.



**Figura 4.28. Graficos volcán utilizados para visualizar las proteínas diferencialmente expresadas para cada tratamiento.** Los gráficos se confeccionaron comparando los valores  $p$  obtenidos mediante t-test en función de la diferencia en abundancia de cada proteína. Las curvas dentro de cada gráfico delimitan los cuadrantes donde las diferencias en abundancia de las proteínas son significativas (superior derecho e izquierdo) y las proteínas se resaltan en rojo con su código de identificación para Uniprot. Los gráficos A), C) y E) muestran las abundancias comparadas para los pares Wt/Ctrol; K107del/Ctrol y K107del/Wt respectivamente; a partir del set de datos obtenidos por PD. B), D) y F) muestran las abundancias comparadas para los pares Wt/Ctrol; K107del/Ctrol y K107del/Wt respectivamente; a partir del set de datos obtenidos por MQ. Los diagramas de Venn representan el número de proteínas diferenciales halladas para cada set de datos y aquellas comunes a ambos.



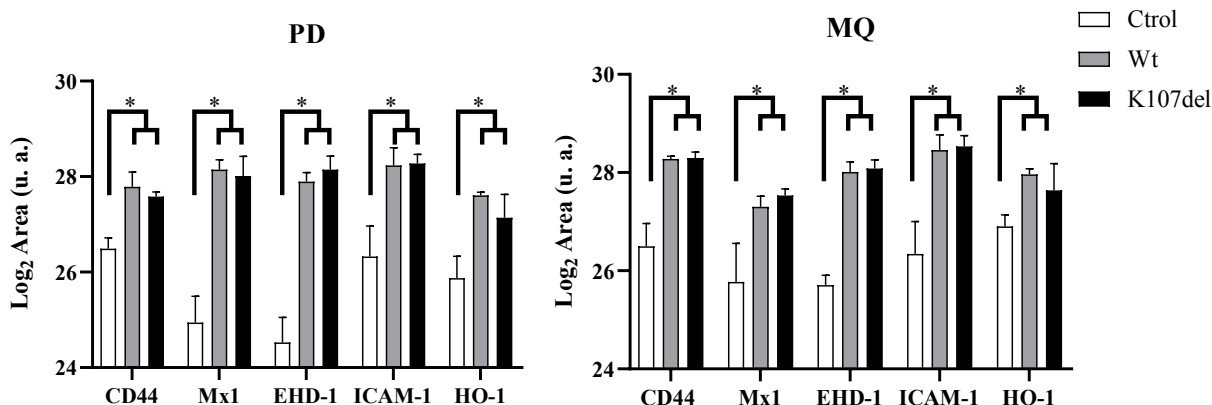
**Figura 4.29. Intensidades de proteínas diferencialmente expresadas determinadas por PD y MQ.** Los gráficos muestran los valores de área promediado de tres experimentos diferentes para cada proteína reportada con niveles diferenciales de expresión (como el  $\text{Log}_2$  del valor de área normalizado)  $\pm$  el desvío estándar. Los datos mostrados se extrajeron de los gráficos tipo volcán para cada par comparativo señalado en el margen superior de cada gráfico sin embargo se muestran todos los valores para evaluar todos los tratamientos simultáneamente en cada gráfico. Los gráficos A); C) y E) se construyeron con el set de datos PD. Los gráficos B) y D) se construyeron a partir del set de datos MQ.

**Desambiguación de nombres para proteínas diferenciales.** El cuadro muestra el *Accession*, nombre del gen y nombre recomendado de las proteínas reportadas en la Figura 4.29. junto a un resumen del rol conocido para cada proteína. (Datos recopilados de <https://www.uniprot.org/>).

Gen	Accession	Nombre recomendado	Rol simplificado
ABHD14B	Q96IU4	Protein ABHD14B	Posible activadora de la transcripción
AK1	P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	Síntesis de ADP a partir de ATP y AMP
ATP13A1	Q9HD20	Manganese-transporting ATPase 13A1	Transporte de manganeso al RE

<b>ATP5F1C</b>	P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Síntesis de ATP
<b>BIN2</b>	Q9UBW5	Bridging integrator 2	Promueve la movilidad y la migración celular
<b>CD44</b>	P16070	CD44 antigen	Receptor de la superficie celular (Célula-Célula)
<b>CPSF5</b>	B9EMD6	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	activadora de la escisión del extremo 3' del pre-mRNA
<b>DBN1</b>	Q16643	Drebrin	Organizadora del citoesqueleto de actina
<b>DNAJC7</b>	Q99615	DnaJ homolog subfamily C member 7	Actua como co-chaperona
<b>EHD1</b>	Q9H4M9	EH domain-containing protein 1	Controla la reorganización / tubulación de la membrana
<b>EIF6</b>	P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6	Se une a la subunidad ribosómica 60S
<b>FABP4</b>	P15090	Fatty acid-binding protein, adipocyte	Proteína transportadora de lípidos en adipocitos
<b>G3BP1</b>	Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	Helicasa dependiente de ATP y magnesio
<b>GSTM3</b>	P21266	Glutathione S-transferase Mu 3	Conjugación de glutatión reducido a electrófilos hidrófobos
<b>H2AC18</b>	Q6FI13	Histone H2A type 2-A	Componente central del nucleosoma
<b>HEBP1</b>	Q9NRV9	Heme-binding protein 1	Puede unirse a porfirinogénicos libres
<b>HMOX1</b>	P09601	Heme oxygenase 1	Escinde el anillo hem en el puente de alfa metano para formar biliverdina
<b>HUWE1</b>	Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	Ligasa que media la ubiquitinación y la degradación proteasomal
<b>ICAM1</b>	P05362	Intercellular adhesion molecule 1	Ligando para la proteína de adhesión leucocitaria
<b>ITB7</b>	U6D7Q6	Integrin beta-7	Putativa: Actividad de receptor en señalización
<b>LONP1</b>	P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	Serin proteasa dependiente de ATP
<b>MT-CO2</b>	P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	Componente de la citocromo c oxidasa
<b>MVP</b>	Q14764	Major vault protein	Requerido para la estructura de la bóveda (vault)
<b>MX1</b>	P20591	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	GTPasa similar a dinamina inducida por interferón con actividad antiviral
<b>MYO18A</b>	Q92614	Unconventional myosin-XVIIIa	Putativa: vincula las membranas de Golgi con el citoesqueleto
<b>NCF2</b>	P19878	Neutrophil cytosol factor 2	activación de la NADPH oxidasa latente (necesaria para la producción de superóxido)
<b>PDAP1</b>	Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	Mejora el crecimiento celular
<b>PSMD7</b>	P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	Componente del proteasoma 26S
<b>PYGL</b>	P06737	Glycogen phosphorylase, liver form	Enzima alostérica en el metabolismo de los carbohidratos
<b>RAGP1</b>	P46060	Ran GTPase-activating protein 1	Activadora de GTPasa
<b>RPL9</b>	P32969	60S ribosomal protein L9	Putativa: Unión al RNA
<b>RSU1</b>	Q15404	Ras suppressor protein 1	Putativa: juega un papel en la vía de transducción de la señal Ras
<b>RUXGL</b>	A8MWD9	Putative small nuclear ribonucleoprotein G-like protein 15	Asociada con snRNP U1, U2, U4 / U6 y U5
<b>S10AB</b>	P31949	Protein S100-A11	Facilita la diferenciación y cornificación de queratinocitos
<b>SFXN1</b>	Q9H9B4	Sideroflexin-1	Media el transporte de serina a las mitocondrias
<b>SOD1</b>	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Destruye radicales libres producidos dentro de las células
<b>SUN2</b>	Q9UH99	SUN domain-containing protein 2	Involucrada en la conexión entre la lámina nuclear y el citoesqueleto
<b>TMEM109</b>	Q9BVC6	Transmembrane protein 109	Putativa: media la respuesta celular al daño del ADN
<b>TMEM33</b>	P57088	Transmembrane protein 33	Reguladora de la red del retículo endoplásmico tubular (RE)
<b>TOMM70</b>	O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	Receptor que acelera la importación de todas las proteínas precursoras mitocondriales

\*Uniprot (actualizado 2020)



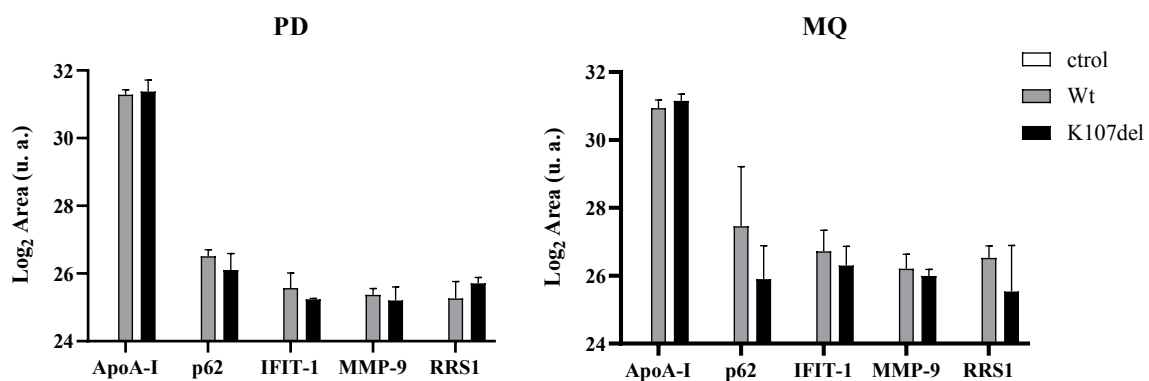
**Figura 4.30. Niveles de expresión de proteínas robustas diferencialmente expresadas en macrófagos THP-1 tratados con Wt y K107del.** Los gráficos muestran las áreas bajo las curvas, determinadas según se indica por PD o MQ para las proteínas robustas. Las áreas reportadas por ambos softwares se transformaron aplicándole el  $\text{Log}_2$  para reducir la dispersión del rango numérico. Las barras representan el promedio de tres experimentos diferentes  $\pm$  el desvío estándar. Los asteriscos muestran las diferencias significativas analizadas por t-test con  $p < 0,05$ .

#### 4.5.4. Estudio de proteínas “ausentes/presentes” no consideradas en el análisis t-test de dos muestras

Como se mencionó, el análisis estadístico t-test de dos muestras permite la comparación de las abundancias relativas de las proteínas comparando sus valores de área. Por la naturaleza de este análisis, son requeridos los valores numéricos de área mayores a cero para al menos dos de tres triplicados ya que se contrastan los valores promedio de un triplicado y el valor  $p$ . Por lo tanto, este tipo de análisis no considera pares comparativos donde no haya un valor numérico de área como promedio en uno de los tratamientos comparados. Es decir, no se consideran en el análisis valores de área no detectables por el espectrómetro de masas. Si bien, este fenómeno podría pensarse como un artefacto técnico/metodológico, la altísima sensibilidad del espectrómetro (Q-Exative) permite deducir que la *no detección* de una proteína se corresponde con niveles debajo de su umbral de detección. Consecuentemente, la intensidad (abundancia) de proteínas por debajo del nivel de detección del equipo pueden considerarse como “proteínas ausentes” a los fines prácticos. Al analizar pormenorizadamente las tablas 4.6. y 4.7. varias proteínas detectadas en algún tratamiento no presentan valores numéricos de área en



alguna/s réplica/s. La ausencia de área en una réplica no indica la ausencia de esa proteína, si es posible hallarla en alguna de las réplicas restantes. Sin embargo, si en un tratamiento dado ninguno de los triplicados presenta al menos un valor de área, es válido considerar “ausente” a dicha proteína en esa condición experimental. Con este criterio se realizó el estudio de “ausencia/presencia” de proteínas a partir de las tablas 4.6. y 4.7. que quedaron fuera del análisis estadístico t-test. Así, una proteína se consideró “ausente” para un tratamiento si no presentó valor numérico en ninguno de sus triplicados y “presente” en otro tratamiento, si presentó valor numérico en todos sus triplicados. Manualmente se analizaron todas las combinaciones posibles y los resultados obtenidos por el análisis de los sets PD y MQ se condensaron mediante el proceso de robustecimiento antes descrito. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.31. donde se visualizan aquellas proteínas presentes en los tratamientos con proteínas recombinantes. No se evidenciaron proteínas ausentes comparando con el Ctrol a partir del tratamiento con Wt y K107del. Es importante aclarar que si bien la ausencia de valor numérico impide el análisis estadístico por t-test, este análisis manual contempla directamente los triplicados, confiriendo validez estadística, pero sin valor p.



**Figura 4.31. Niveles de expresión de proteínas robustas “ausentes/presentes” en macrófagos THP-1 tratada partir de los tratamientos con Wt y K107del.** Los gráficos muestran las áreas bajo las curvas, determinadas según se indica por PD o MQ para las proteínas robustas. Las áreas reportadas por ambos softwares se transformaron aplicándole el Log<sub>2</sub> para reducir la dispersión del rango numérico. Las barras representan el promedio de tres experimentos diferentes ± el desvío estándar. Los tratamientos control no presentaron valores de área detectables en ninguno de los softwares utilizados para la identificación y cuantificación proteica.

#### 4.5.5. Resumen simplificado de los reportes

Tanto los tratamientos con Wt y K107del sobre macrófagos THP-1 indujeron la sobreexpresión de las proteínas: *CD44 antigen* (CD44 o HCAM), *Homeobox protein EMX1* (Mx1), *EH domain-containing protein 1* (EHD1), *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1), *Heme oxygenase 1* (HO-1), *apolipoprotein A-I* (apoA-I), *sequestosome-1* (SQSTM1/p62), *Matrix metalloproteinase-9* (MMP-9), *Ribosome biogenesis regulatory protein homolog* (RRS1). Puede observarse que tanto en el estudio de niveles diferenciales de expresión como en el estudio de ausencia/presencia de proteínas, sólo se observan como proteínas robustas aquellas que aumentaron sus niveles de expresión respecto al tratamiento control cuando el tratamiento fue con Wt o K107del. Sin embargo, entre los tratamientos con Wt y K107del no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en estas proteínas robustas. Por lo tanto, analizando únicamente los niveles de expresión de proteínas robustas no puede determinarse un efecto diferencial en la respuesta celular a la incubación con K107del respecto a la Wt.

#### **4.5.6. Validación metodológica de los resultados: precisión de la tecnología Orbitrap**

Como se aprecia en la figura 4.31. una de las proteínas detectadas para muestras tratadas con proteínas recombinantes fue la misma apoA-I. Es posible deducir que se trata de la proteína agregada exógenamente, debido a que los niveles de expresión de apoA-I en macrófagos son basales (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118137-APOA1/celltype>); pero más importante aún, porque no se detecta apoA-I en ninguno de los tratamientos control.

Como estrategia de control de la precisión metodológica, se aprovechó la ausencia de la lisina 107 esperable para la “apoA-I” detectada en las muestras tratadas con K107del junto al patrón de digestión triptica realizada durante el procesamiento de las muestras (previo al análisis LC-MS). Cabe recordar que la tripsina hidroliza los enlaces peptídicos en la posición carboxílica de cualquier arginina (R) o lisina (K). Con estos datos y considerando la secuencia de las Wt y la K107del se analizó exhaustivamente

entre los péptidos reportados como “apoA-I” por PD, hasta hallar aquellos que pudieran evidenciar la ausencia de la lisina 107.

10	20	30	40	50	60
DEPPQSPWDR	VKDLATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL
70	80	90	100	110	120
REQLGPVTQE	FWDNLEKETE	GLRQEMSKDL	EEVKAKVQPY	<b>LDDFQ<b>K</b>KWQE</b>	EMELYRQKVE
130	140	150	160	170	180
PLRAELQEGA	RQKLHELQEK	LSPLGEEMRD	RARAHVDALR	THLAPYSDEL	RQRLAARLEA
190	200	210	220	230	240
LKENGGARLA	EYHAKATEHL	STLSEKAKPA	LEDLRQGLLP	VLESFKVSFL	SALEEYTKKL
243					
NTQ					

Tanto las muestras tripsinizadas provenientes del tratamiento Wt como del tratamiento K107del pueden contener el péptido KVQPYLDDFQK ubicado en las posiciones 94-104 para la Wt (96-106 en la apoA-I nativa). Sin embargo, el péptido KWQEEMELYRQK ubicado entre los residuos 105-116 (107-118 en la apoA-I plasmática) sólo podría encontrarse en digestiones trípticas de la Wt pero no de la K107del.

Como se observa mediante la abundancia neta de los péptidos identificados como apoA-I (ver cuadro 4.1.) los datos provenientes del PD, indican que apoA-I fue identificada en cada triplicado provenientes de células tratadas con Wt o K107del. Entre los péptidos identificados como apoA-I asignados con el nivel de confianza *High* se hallaron aquellos mencionados entre las posiciones 96-118 cuyas intensidades normalizadas se indican en el cuadro. Estos resultados sugieren la evidencia de la delección de la lisina 107 para las muestras tratadas con K107del ya que sólo se halló el péptido KWQEEMELYRQK en las muestras tratadas con Wt; mientras que el péptido KVQPYLDDFQK (que podría considerarse como péptido control) se encuentra en todos los triplicados Wt y K107del.

**Cuadro 4.1.** En el cuadro se indican las abundancias para los péptidos indicados, reportados por PD

Abundancia neta de los péptidos indicados por muestra (unidades arbitrarias)									
Secuencia peptídica	Ctrl			Wt			K107del		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
VQPYLDDDFQK	ND	ND	ND	2,4E+09	2,0E+09	7,7E+08	1,5E+09	9,1E+08	2,6E+09
KWQEEMELRQK	ND	ND	ND	2,7E+07	1,0E+08	ND	ND	ND	ND

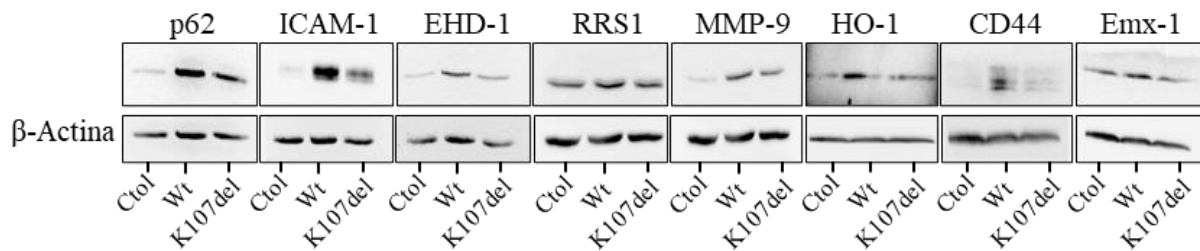
*\*ND: No Detectable*

#### 4.5.7. Validación bioquímica de los hallazgos realizados por Orbitrap

Como se describió anteriormente la confección del listado de las proteínas identificadas y robustas se realizó con el fin de minimizar la probabilidad reportes falsos. Con esta lista de proteínas reducida se procedió a validar bioquímicamente los hallazgos mediante el análisis por Western blot. Para ello se realizó una nueva tanda de experimentos, con nuevos lotes de proteína (provenientes de nuevas purificaciones), nuevos lotes de insumos celulares y otro lote de células frescas (utilizando crioviales con células recién descongeladas). Los experimentos se llevaron a cabo, bajo las mismas condiciones: incubando los macrófagos con Wt y K107del durante 12 h a 30µg/ml final de proteínas recombinantes. El extracto proteico se obtuvo mediante extracción con RIPA separando los restos celulares de las proteínas en el sobrenadante por centrifugación a 20.000 r.p.m. durante 20' (no se continuó con los pasos respectivos a la preparación de muestras para el análisis LC-MS). Los sobrenadantes se alicuotaron y congelaron inmediatamente a -80°C.

Para el análisis por Western blot, las cantidades de proteína total a sembrar por calle se ajustaron conforme a la adecuada visualización de las bandas, siempre dentro del rango de 8 a 40µg de proteína total por calle. En todos los casos la proteína total de las muestras a sembrar se cuantificó mediante el kit micro-BCA y se utilizó a la β-actina para normalizar las intensidades de las bandas y como control de carga. Para ajustar las concentraciones de anticuerpo primario se realizó un ensayo Dot blot (no mostrado) antes del análisis por Western blot, y en todos los casos las diluciones de anticuerpos

primarios fueron de 1:100; 1:200 o 1:500. Los resultados mostrados en la figura 4.32. validaron los hallazgos reportados anteriormente mediante el análisis orbitrap. Desafortunadamente el anticuerpo anti-IFIT-1 no se encuentra disponible comercialmente, lo que imposibilitó su validación vía Western blot. Por su parte al deducir que el reporte de apoA-I consta de aquella agregada en los experimentos no se consideró necesaria su validación.

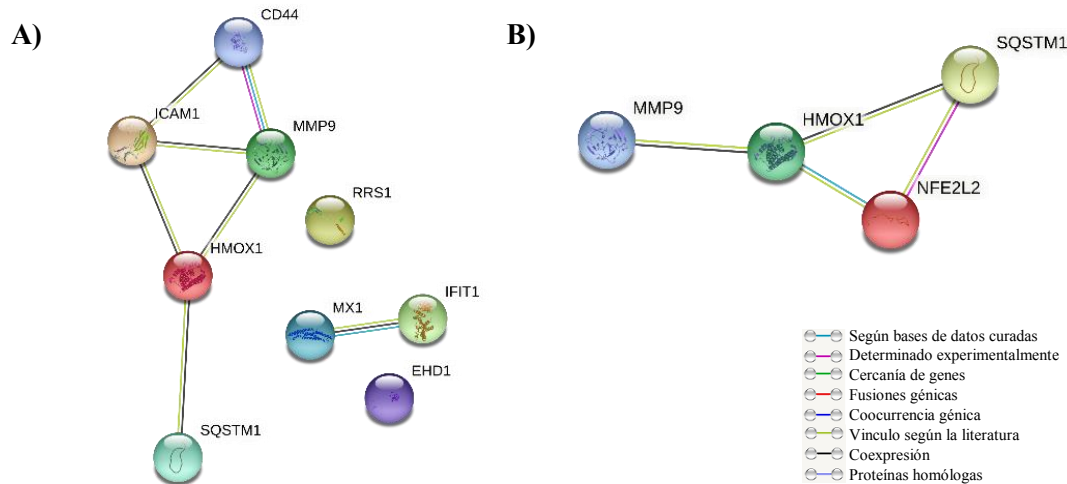


**Figura 4.32. Validación mediante Western blot de los niveles de expresión de proteínas robustas en macrófagos THP-1 a partir del tratamiento con Wt y K107del.** Las imágenes muestran el resultado del análisis por western blot de las proteínas mencionadas utilizando anticuerpos primarios en diluciones que variaron de 1:100 a 1:500. Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa se utilizaron en diluciones de 1:10000 o 1:5000. Las imágenes se digitalizaron utilizando el equipo Chemidoc variando los tiempos de exposición acorde a la visualización de las bandas. Como se puede observar, todas las proteínas analizadas confirmaron los resultados obtenidos mediante Orbitrap.

#### 4.5.8. Selección de proteínas target para su estudio en el contexto aterosclerótico

Una vez validadas todas las proteínas robustas se procedió a realizar una revisión bibliográfica de cada una de ellas utilizando motores de búsqueda para literatura científica y diversas bases de datos. Como se grafica en la figura 4.33., no se hace evidente un vínculo directo y lineal que permita asignar un posible rol metabólico relacionado a la sobreexpresión de todas estas proteínas como conjunto. Sin embargo, de la búsqueda bibliográfica se destaca el nodo HO-1, p62, MMP-9. Como se representa en la figura 4.33.B), estas tres proteínas se encuentran vinculadas por el factor Nrf2, (discutido más adelante en la sección 5.6.). Por fuera del nodo, en particular la proteína polifuncional p62 se presenta como un posible target para el tratamiento de la aterosclerosis, lo que pondera su importancia para la medicina traslacional. Estos

hechos motivaron que la investigación continúe en torno a la búsqueda del vínculo mecánico entre apoA-I y la sobreexpresión de p62 observada [77].



**Figura 4.33. Relación entre las proteínas robustas utilizando redes de interacción proteína-proteína.** Las figuras muestran los resultados del estudio de interacción proteína-proteína utilizando la base de datos String. Las proteínas representadas por su código de letras sobre esferas se conectan entre sí mediante líneas de colores según se indica en el gráfico. La figura **A)** muestra todas las proteínas robustas analizadas en String <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bqqzm0PkJ1r&sessionId=I2PpeCOnQ5dr>. La imagen **B)** muestra el nodo p62 (SQSTM1); HO-1 (HMOX1); MMP9 y el factor Nrf2 (NFE2L2) <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bN90UnenezHs&sessionId=bDxkCrrgGoLA>.

#### 4.5.9. Criterio de selección de inhibidores para el estudio de la dependencia en la sobreexpresión de p62 y la vía Nrf2, a partir del tratamiento con Wt y K107del.

En este apartado se buscó comprobar si la sobreexpresión de p62 a partir del tratamiento con proteínas recombinantes fue dependiente a la vía Nrf2-Keap1 (detallada en 1.8.2. Introducción); planteando como estrategia el uso de inhibidores de esta vía. Para ello se realizó una aproximación general utilizando diferentes inhibidores cuyos puntos de inhibición accionen en diferentes niveles de la vía. Este criterio se planteó para probar las eficiencias de los inhibidores y a la vez evaluar a qué nivel podría actuar la apoA-I

generando la sobreexpresión de p62 (si la vía Nrf2 estuviese implicada). Estos inhibidores se resumen en el cuadro 4.2.

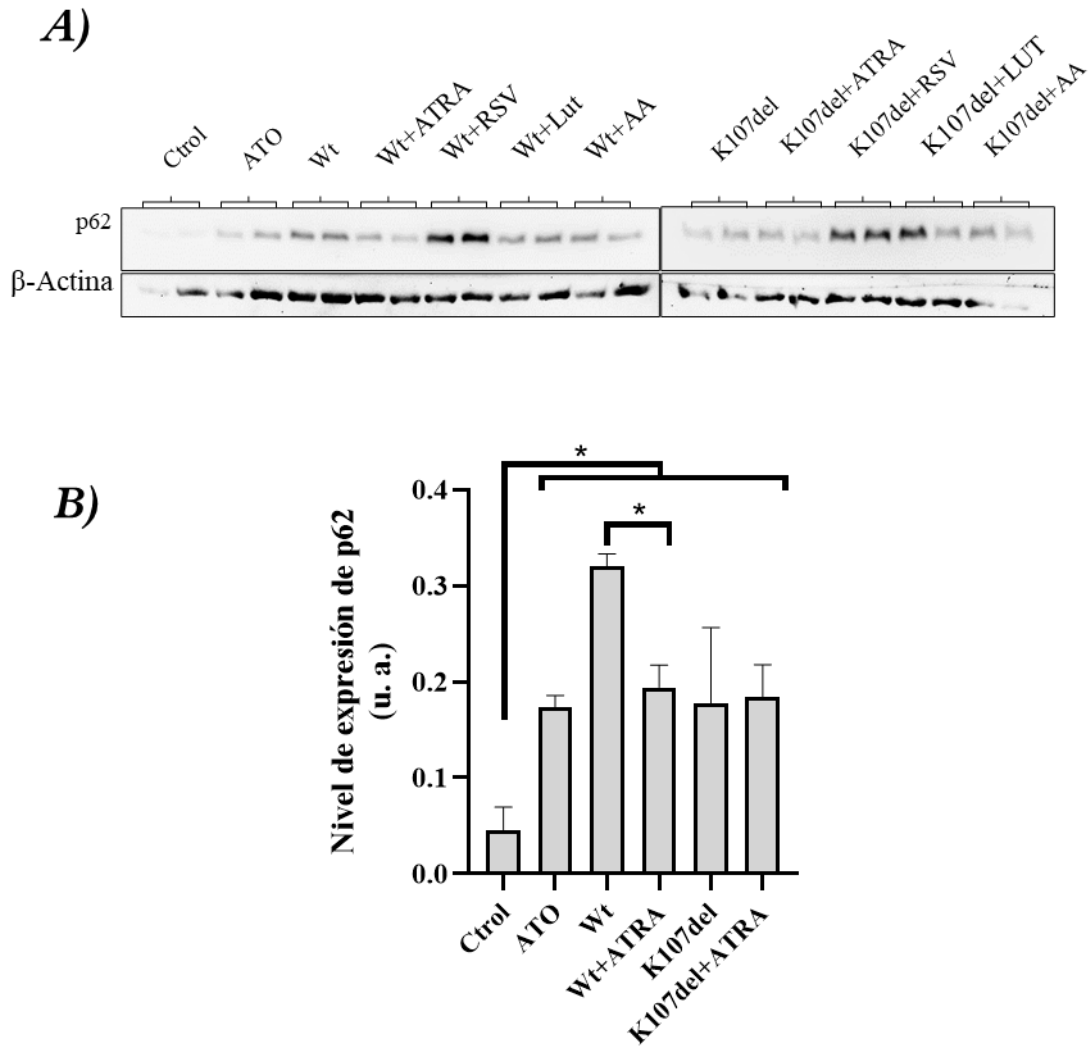
**Cuadro 4.2. Clasificación y mecanismos de acción de inhibidores de la vía Nrf2-Keap1.**

Sustancia	Clasificación	Concentración inhibitoria	Efecto comprobado en THP-1	Efectos contradictorios reportados	Mecanismo de acción
Ácido ascorbico	Vitamina	1mM		Si	disminuye la traslocación a núcleo de Nrf2
Ácido transretinóico	Derivado de vitamina	1µM	Si	No	disminuye la traslocación a núcleo de Nrf2; disminuye la unión de Nrf2 al ADN
Resveratrol	Polifenol	>150µM		Si	disminuye la expresión de Nrf2
Luteolina	Flavonoide	1-20µM		Si	aumenta la degradación de mRNA de Nrf2

Se llevaron a cabo entonces los experimentos de coincubación con Wt y K107del y los diferentes inhibidores junto con un inductor de la vía Nrf2 (ATO) a modo de control positivo, como se muestra en la figura 4.34. El resultado muestra que algunas de las sustancias presentaron efectos inhibitorios, activadores o nulos sobre la expresión de p62 comparado al tratamiento con proteínas únicamente. Sin embargo, el ATRA (siendo el mejor candidato por haberse testeado previamente en macrófagos THP-1 [61]) mostró una disminución de los niveles de p62 visible a simple vista, comparado con las células tratadas sin el inhibidor. También se puede observar en la figura que todos los tratamientos llevados a cabo con Wt o K107del aumentaron significativamente los niveles de expresión de p62, al igual que el tratamiento con el inductor de Nrf2: ATO.

Resulta llamativo observar que, si bien el tratamiento con K107del aumentó los niveles de expresión de p62 de manera significativa respecto al control, estos niveles no descendieron en presencia de los inhibidores de Nrf2; al contrario de lo observado para la Wt. Para este experimento se calcularon las densidades ópticas y se normalizaron a  $\beta$ -actina para su análisis estadístico. Como se puede observar en la figura 4.34.B) esos resultados se comprueban estadísticamente. En la figura se muestra únicamente los resultados de los tratamientos con proteínas, el activador ATO y los cotratamientos

proteicos con ATRA únicamente ya que el resto de los inhibidores ensayados no presentaron efecto inhibitorio significativo.

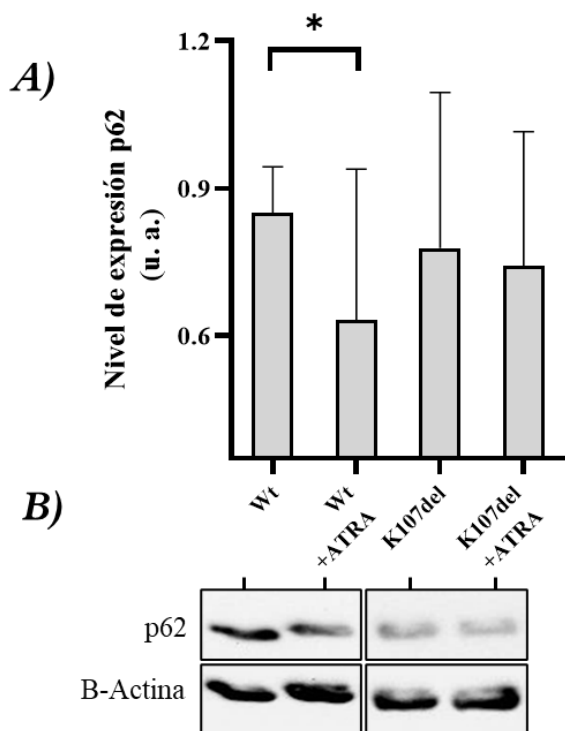


**Figura 4.34. Niveles de expresión de p62 luego del tratamiento con diversos inhibidores de la vía Nrf2-Keap1 en macrófagos THP-1 tratados con Wt y K107del.** La imagen A) muestra los resultados del análisis por Western blot luego de separar las proteínas mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%, sembrado 10µg de proteína total por calle. Las células se incubaron durante 12 horas con los tratamientos indicados siendo el control: incubaciones con RPMI (ss); ATO: trióxido de arsénico (activador de Nrf2); ATRA: ácido transretinoico; RSV: resveratrol; Lut: luteolina; AA: ácido ascórbico. El grafico B) muestra los niveles porcentuales de p62 en macrófagos THP-1 luego del tratamiento con Wt y K107del únicamente o con el inhibidor ATRA. Las barras muestran el promedio de tres experimentos distintos ± el desvío estándar. Los asteriscos \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) evaluadas por t-test para las condiciones indicadas.



#### 4.5.10. Determinación de la acumulación de p62 por el tratamiento proteico, de manera dependiente de la vía Nrf2

En base a los resultados del apartado anterior, se continuó con el estudio llevando a cabo un set de nuevos experimentos variando los lotes de proteínas y los reactivos celulares para constatar el resultado. Así, luego de realizar cuatro experimentos distintos sumando once réplicas totales de los tratamientos para el caso de la Wt y Wt+ATRA y tres experimentos con siete réplicas para el caso de la K107del y K107del+ATRA, se promediaron todos los datos normalizados a  $\beta$ -actina, para su análisis estadístico. Estos datos se utilizaron para construir el gráfico de la figura 4.35. Como se puede observar los niveles de p62 aumentan significativamente al incubar las células con la Wt, pero en presencia del inhibidor ATRA estos descienden significativamente ( $p > 0,05$ ) entre un 20 a 47%. En el caso de la incubación con K107del, el nivel de p62 aumenta de manera significativa respecto al tratamiento control sin proteínas y de manera similar a la incubación con la Wt, sin embargo, en el tratamiento con K107del, estos niveles no descendieron en presencia del ATRA como si ocurrió en el caso de la Wt.



**Figura 4.35. Confirmación de niveles de expresión de p62 en macrófagos THP-1 tratados con Wt y K107del y ATRA.**

En la imagen se muestra los niveles porcentuales de p62 provenientes de cuatro experimentos y once réplicas para la Wt y de tres experimentos y siete réplicas para la K107del. En A) las barras representan el promedio de las replicas mencionadas para cada caso  $\pm$  el desvío estándar y los asteriscos representan diferencias significativas por t-test con valores  $p < 0,05$ . La imagen B) muestra en un experimento distinto al mostrado en la figura 4.34. la trazabilidad de los resultados.

# 5. DISCUSIÓN

## 5.1. Consideración general

Para abordar la discusión de los resultados obtenidos es importante tener en consideración el objetivo general planteado en esta tesis. A lo largo de este trabajo se intentó responder qué mecanismo/s subyace/n a la fisiopatología manifestada en los portadores de la mutante de delección K107del.

Todos los experimentos realizados se plantearon para comprobar si la “K107del exhibe diferencias respecto a la Wt” en tres niveles posibles:

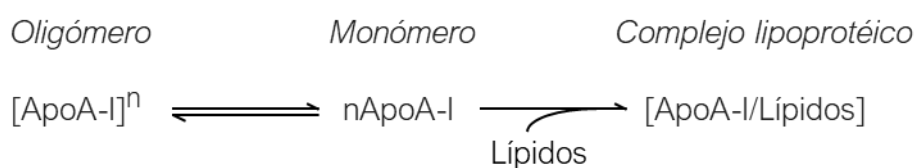
- 1) A nivel funcional utilizando modelos de interacción proteína /lípidos.
- 2) A nivel estructural utilizando experimentos de entrecruzamiento.
- 3) A nivel de la función y/o respuesta celular de macrófagos THP-1.

## 5.2. Influencia de la delección de la lisina 107 en la funcionalidad de apoA-I

Biofísica Funcional					
Experimento	Concentración proteica	Lípidos ensayados	Par comparativo	¿Presentó diferencias?	¿Cuáles?
Pérdida de contenido en LUVs	Suboligomérica	POPC; POPC:Col (4:1)	WtK 107del	No	
Pérdida de contenido en LUVs	Oligomérica	POPC; POPC:Col (4:1)	WtK 107del	No	
Interacción con monocapas	Suboligomérica	POPC; POPC:Col (4:1)	WtK 107del	No	
Micelización de MLVs	Suboligomérica	DMPC	WtK 107del	No	
Micelización de MLVs	Suboligomérica	DMPC	Wt+BS <sup>3</sup> /K107del+BS <sup>3</sup>	Si	Mayor capacidad de micelización por K 107del+BS <sup>3</sup>
Partículas por micelización - PAGE	Suboligomérica	DMPC	WtK 107del	No	
Partículas por micelización - PAGE	Suboligomérica	DMPC	Wt+BS <sup>3</sup> /K 107del+BS <sup>3</sup>	No	
Partículas por micelización - TEM	Suboligomérica	DMPC	WtK 107del	No	
Partículas por micelización - TEM	Suboligomérica	DMPC	Wt+BS <sup>3</sup> /K107del+BS <sup>3</sup>	Si	Diferencia en la forma de las partículas Wt+BS <sup>3</sup> +DMPC
Partículas asistidas por colato - PAGE	Suboligomérica	DMPC:Colato	WtK 107del	No	
Partículas asistidas por colato - PAGE	Suboligomérica	DMPC:Colato	Wt+BS <sup>3</sup> /K 107del+BS <sup>3</sup>	No	
Interacción con nLDL	Oligomérica	LDL nativas	WtK 107del	No	
Ensayo de binding con nLDL	Oligomérica	LDL nativas	WtK 107del	No	
Ensayos en plasma total	Oligomérica	Fración plasmática completa	WtK 107del	No	

Cuadro 5.1. Resultados de los experimentos de biofísica funcional resumidos.

Para comenzar a discutir este apartado, en el cuadro 5.1. se resumen los resultados obtenidos esquemáticamente acorde a la consideración general antedicha. Como puede observarse; utilizando diversos modelos no se lograron evidenciar diferencias funcionales para K107del y la Wt al caracterizarlas en su condición nativa y libre de lípidos. Este resultado se refleja tanto en modelos biofísicos puros (sistemas lipídicos simples) como en ensayos con lipoproteínas plasmáticas, demostrando que la mutación no afecta la interacción con sistemas lipídicos simples, así como tampoco con mezclas complejas de lípidos y proteínas accesorias (lipoproteínas plasmáticas). Curiosamente, la concentración proteica parece no tener efectos sobre la eficiencia en la inducción de pérdida de contenido de LUV y/o en la interacción con nLDL. Esta idea parece coincidir con los trabajos de Massey 1981 y Jayaraman 2011 quienes sostienen que la lipidación de apoA-I solo ocurre mediante el estado monomérico de la misma; es decir que los monómeros son los principales encargados de interaccionar con lípidos. Como se muestra esquemática y simplificada en la ecuación 1, puede considerarse al equilibrio de autoasociación de apoA-I como un fenómeno dinámico y elástico. De manera tal que, aunque los monómeros libres de lípidos pasen a formar parte del complejo [proteína-lípido], la concentración monomérica libre de lípidos podría permanecer constante por el principio de Le Chatelier; hallando un *reservorio* de monómeros en los estados oligoméricos.



**Ecuación 1. Formación de lipoproteínas mediante monómeros de apoA-I.** La ecuación simplifica la hipótesis del “monómero funcional” propuesta por Massey *et al.* 1981. Tomada y modificada Massey *et al.* 1981 doi: [10.1016/0006-291x\(81\)91768-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(81)91768-x).

Esta hipótesis podría parecer inválida al revisar los resultados de la interacción con DMPC de los oligómeros entrecruzados, ya que ambas variantes son capaces de formar algún tipo de partícula lipoproteica en cualquiera de sus estados oligoméricos. Este resultado es novedoso y muestra que tanto monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros

de apoA-I son capaces de formar complejos con lípidos. A raíz de la evaluación de la fluorescencia intrínseca, se puede suponer que estos complejos conservan la conformación monomérica ya que no presentan corrimientos espectrales. Esta afirmación requiere ensayos más detallados ya que los cuatro triptófanos de apoA-I se encuentran en la región N-terminal (W8; W 50; W72; W108) y no necesariamente dan información certera sobre la región C-ter. Otro dato sumamente llamativo es que todos los oligómeros forman partículas de igual tamaño que los monómeros al interactuar con DMPC (figura 4.22.). Al analizar los corrimientos espectrales en los oligómeros de ambas variantes libres de lípidos, tampoco se observan corrimientos entre los oligómeros de cada variante. Estas observaciones permiten imaginar a los oligómeros como “aglomeraciones” de monómeros interaccionando entre sí, pero sin modificar su estructura monomérica. Es decir, que los oligómeros *per sé* parecieran no poseer una estructura o función diferenciada a la apoA-I monomérica. Sin embargo, cabe recordar que en todos los casos se analizaron los oligómeros entrecruzados lo que restringe las posibilidades de reacomodamiento por parte de las proteínas en un complejo lipidado. Continuando entonces con la hipótesis del “monómero funcional”, alteraciones estructurales o funcionales producidas en la apoA-I monomérica a causa de la delección de la lisina 107 podrían observarse con mayor claridad al analizar exclusivamente los monómeros.

Se sabe que la K107del presenta un corrimiento al rojo de ~2-3 nm, junto con un mayor acceso del bis-ANS a las regiones hidrofóbicas de la proteína. Estos reportes permiten suponer que 1) la K107del presenta una mayor flexibilidad conformacional (como sostienen los autores [31]); o 2) que al menos algún triptófano se encuentra más expuesto al entorno acuoso como es el caso del W108. Al estudiar la función de K107del comparativamente a la Wt (ambas en su estado monomérico), se evidencia que las alteraciones estructurales mencionadas no acarrearán un efecto evidente en la funcionalidad de ambas variantes. Esto puede deberse justamente a la gran flexibilidad conformacional intrínseca de apoA-I. Ya que alteraciones estructurales pequeñas en la proteína libre de lípidos pueden ser compensadas cuando la proteína se reacomoda o “rearregla” en su estado lipidado (por ejemplo, al formar los cinturones ecuatoriales de las rHDL). Este efecto podría disimular alteraciones estructurales “leves” a nivel

terciario. Inclusive se sabe que alteraciones mayores; por ejemplo, la sustitución de los 4 triptófanos por fenilalaninas, no acarrear consecuencias en la capacidad de micelización del DMPC como reportaron Jayaraman *et al.* 2011.

Para estudiar la posible capacidad de rearrreglo por parte de las variantes al interactuar con lípidos, se decidió bloquear su flexibilidad conformacional intrínseca entrecruzando directamente los monómeros de cada variante. Este proceso permite obtener una “instantánea” de la estructura terciaria monomérica. Como se puede apreciar en los ensayos de micelización del DMPC (sección 4.2.4. de Resultados), los monómeros de Wt entrecruzados sufren mayores alteraciones funcionales comparativamente a la K107del. Mediante estos ensayos no puede definirse si estas alteraciones son debidas a que la K107del tiene una lisina menos para que el BS<sup>3</sup> reaccione (es decir una explicación independiente a la estructura). Sin embargo, podría considerarse que el hallazgo de alteraciones en la forma tridimensional de las lipoproteínas obtenidas con Wt+BS<sup>3</sup>/DMPC mediante TEM vincula la restricción estructural a la pérdida de su función, como se observa en la figura 4.12. Como se mencionó y de acuerdo con la hipótesis de una mayor flexibilidad conformacional por parte de la K107del, la menor afectación funcional para K107del+BS<sup>3</sup> comparativamente a la Wt+ BS<sup>3</sup> podría explicarse por: 1) alteraciones en su equilibrio *plegado*  $\rightleftharpoons$  *desplegado* (a nivel secundario o terciario), hallándose más tiempo *desplegada* que la Wt; o 2) cambios permanentes en su estructura terciaria. Lamentablemente ninguna de estas posibilidades puede descartarse al evaluar la fluorescencia intrínseca de las variantes libre de lípidos o lipidadas ya que el corrimiento neto de ~2 nm observado en la K107del se mantiene en las rHDL. Mediante el estudio de la fluorescencia intrínseca utilizando estas metodologías tampoco se puede confirmar si los cuatro triptófanos o sólo el W108 presentan una mayor exposición al solvente en la K107del libre de lípidos o lipidadada. Como se puede adelantar, basándose en los análisis funcionales realizados a lo largo de esta tesis; la explicación de la fisiopatología observada para K107del pareciera encontrar su fundamento en otras dos causas posibles: alteraciones estructurales o bien en su funcionalidad/respuesta celular.

### 5.3. Influencia de la delección de la lisina 107 en la estructura terciaria

Para realizar un resumen de resultados, en este apartado se puede observar en el cuadro 5.2. A diferencia de los experimentos realizados para analizar la funcionalidad de Wt y K107del, la mayoría de los análisis estructurales mostraron que estas variantes presentan diferencias estructurales entre sí. Es evidente entonces, que posiblemente la fisiopatología presentada por los portadores de K107del ha de encontrar su explicación -o parte de ella- en motivos estructurales.

Biofísica Estructural			
Experimento	Condición	¿Presentó diferencias?	¿Cuáles?
Equilibrio de multímeros - PAGE	Nativa	No	
Entrecruzamiento monomérico - PAGE	Entrecruzadas	No	
Entrecruzamiento oligómeros - PAGE	Entrecruzadas	Si	Menor capacidad de oligomerización para K107del
Abundancia de multímeros entrecruzados - FPLC	Entrecruzadas	Si	Menor capacidad de oligomerización para K107del
Fluorescencia intrínseca en monómeros libres de lípidos	Nativa	Si	Corrimiento al rojo de ~2 nm para K107del (1er reporte Ramella <i>et al.</i> 2012)
Fluorescencia intrínseca en monómeros libres de lípidos	Entrecruzadas	Si	Corrimiento al rojo de ~2 nm para K107del
Fluorescencia intrínseca en oligómeros libres de lípidos	Entrecruzadas	Si	Corrimiento al rojo de ~2 nm para K107del
Fluorescencia intrínseca en oligómeros + DMPC	Entrecruzadas	Si	Corrimiento al rojo promedio de ~2 nm para K107del
Domínios interactuantes en estado monomérico	Entrecruzadas	Si	Nodos y xlinks diferenciales entre Wt y K107del

**Cuadro 5.2. Resultados de los experimentos de biofísica estructural resumidos.**

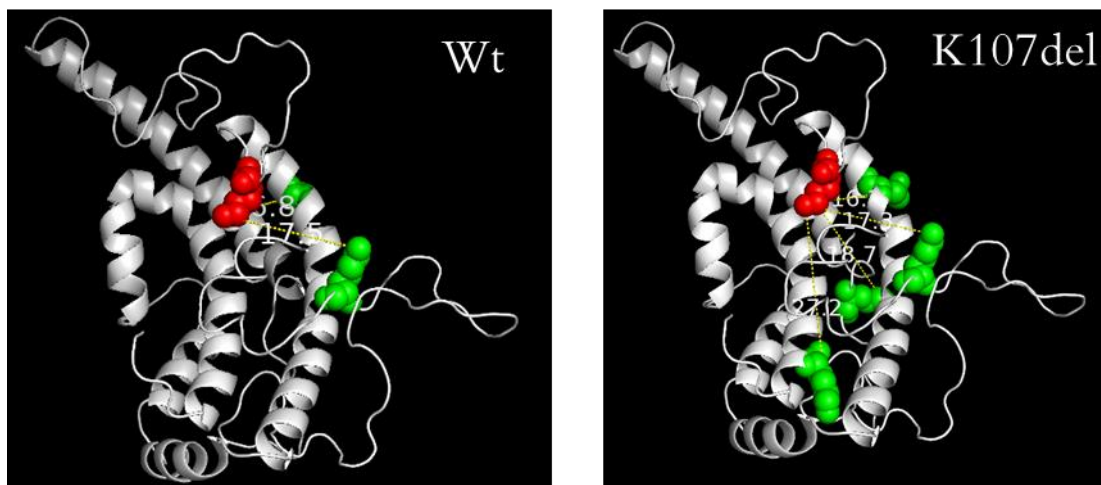
Se observó que K107del presenta una capacidad considerablemente menor para la formación de oligómeros como reflejan las abundancias porcentuales calculadas mediante FPLC en el apartado 4.3.3. de Resultados. Sin embargo y llamativamente, cuando las variantes no se encuentran entrecruzadas químicamente este efecto parece disminuir o al menos no resulta tan notorio al ser analizado mediante PAGE (figura 4.17.). Estos resultados parecen indicar que la K107del posiblemente manifieste su comportamiento alterado al sinergizar con otro tipo de modificaciones post traduccionales como oxidaciones, entrecruzamiento, clivaje enzimático, etc. Esta

hipótesis recientemente propuesta (Díaz y Gisonno *et al.* 2020), parece coincidir con la bibliografía disponible ya que los efectos funcionales reportados para la K107del junto a sus consecuencias fisiológicas son contradictorias en numerosos estudios. Por ejemplo, Nofer *et al.* 1995, reportaron que sólo los portadores masculinos de K107del presentaron niveles bajos de HDL. ¿Podría este efecto vincularse a los hábitos? Los factores exógenos como ser tabaquismo, dieta, etc. afectan la calidad y cantidad de las HDL. Por otra parte, en el caso de los reportes clínicos algunas observaciones contrapuestas podrían explicarse debido a que los análisis se realizaron siempre sobre sujetos heterocigotas para apoA-I<sup>K107del</sup>.

Mas allá de la expresión fenotípica de la variante, no hay un acuerdo sobre las consecuencias fisiopatológicas de la mutación. Si bien el hallazgo de la portación de apoA-I<sup>K107del</sup> en pacientes se produce al diagnosticar patologías como aterosclerosis severa, amiloidosis o dislipemias (generalmente niveles bajos de C-HDL), Utermann 1982, Rall 1984, Moriyama 1996, Amarzguioui 1998 y Ljunggren 2013 discutieron el hecho de no poder encontrar una relación “directa” y “predecible” entre la portación de la variante y la clínica manifestada en los pacientes. Sin embargo, a pesar de que las consecuencias fisiológicas observadas en los portadores de APOA-I<sup>K107del</sup> no son claras, las alteraciones estructurales parecen ser un hecho confirmado. Ya en 1984 Rall hipotetizó sobre las posibles consecuencias estructurales de la delección de la lisina107 al disrumpir el registro alfa helicoidal de la proteína. Por otra parte, la menor capacidad de oligomerización observada para K107del en esta tesis es consecuencia directa de la delección de la K107, ya sea por la ausencia del grupo -NH<sub>2</sub> en la posición 107 o bien por la disrupción alfa helicoidal causada por ausencia de un aminoácido. En este sentido Gorskova *et al.* 2014 utilizando una mutante de sustitución K107A sugirieron que la ausencia del grupo -NH<sub>2</sub> en la posición 107 no altera *per sé* al plegamiento de la apoA-I. Sin embargo, los resultados del análisis de dominios interactuantes por entrecruzamiento presentados en esta tesis muestran que la K107del presenta una estructura terciara distinta o *alterada* respecto a la Wt. Posiblemente esta alteración se vincule directamente con la capacidad de oligomerización notablemente reducida para la K107del. Por su parte Ramella *et al.* reportaron una mayor laxitud estructural en presencia de guanidina por parte de K107del respecto a la Wt. Concordantemente con

esta hipótesis, en este trabajo se descubrió que el entrecruzamiento entre las K77-K88 disminuye un 67% en la K107del cuando se compara con el mismo péptido entrecruzado en la Wt. Este hallazgo adquiere valor al observar el modelo consensuado de apoA-I donde las H4 y H5 que se encuentran yuxtapuestas, estarían distantes una de la otra en el caso de la K107del, vinculado una estructura más laxa. Al observar los “nodos” de entrecruzamientos (*crosslinkings*) diferenciales compuestos por una misma lisina interactuando con otras, se puede llegar a conclusiones similares. Ciertas lisinas parecen de utilidad como reporteras de la estructura terciaria: por ejemplo, la K118 se encuentra interactuando con las K107 y K226 mayoritariamente en la Wt; mientras que en la mutante se encuentra interactuando mayoritariamente con las K12, K106, K182 y K226, como se ilustra en la figura 5.1. Lo mismo ocurre al evaluar el nodo N-ter, que sólo en la K107del se encontró mayoritariamente unido a las K40, K133, K140 y K182. Estos resultados muestran que K107del presenta un patrón de entrecruzamiento diferencial a la Wt apoyando la idea de una mayor flexibilidad conformacional o de una estructura terciaria diferente a la Wt. Cabe considerar que, en algunos casos las mismas lisinas entrecruzadas son reportadas como diferenciales tanto para Wt como para la K107del; esto puede deberse a patrones de fragmentación diferenciales por la tripsinización como se observa en la tabla 4.4. para los xlinks 1); 9); 10); 24); 25); formados entre el N-ter y la K12. A su vez pueden ocurrir PTM diferenciales que generan valores de m/z distintos, como es el caso de eventuales oxidaciones que aumentan el valor de MH en 15.999 kDa, como se observa en la tabla 4.4. para los xlinks 5) y 6). En cualquiera de las dos situaciones mencionadas, la delección de la K107 es responsable de esas diferencias y resta determinar de qué manera estas alteraciones son consecuencia de la delección de la lisina. En su conjunto, estos datos sugieren que la lisina 107 es clave para mantener la estructura terciaria de la apoA-I monomérica libre de lípidos.





**Figura 5.1. Lisinas interactuantes para Wt y K107del dentro del nodo “K118”.** En la figura se muestran las lisinas interactuantes que forman parte del nodo K118 sobre el modelo consensuado de apoA-I. Ambas proteínas se modelaron mediante Swissprot y con el plugin Modeller 9.24. en el software Chimera 1.14. utilizando la secuencia recombinante de Wt y K107del (sin la lisina 107). No se obtuvieron diferencias significativas en los modelos obtenidos tanto por Swissprot como por Modeller La imagen se construyó utilizando el modelado obtenido de Swissprot graficado en PyMol, donde la lisina 118 se muestra en rojo para ambas variantes, en verde: las lisinas 107 y 226 para la Wt, y las lisinas 12, 106, 182 y 226 para la K107del. La línea discontinua amarilla indica las distancias en Å, señaladas en la imagen.

## 5.4. Influencia de la delección de la lisina 107 en la función/respuesta celular

Los resultados que se discutirán aquí presentan la ventaja de haberse obtenido con las técnicas más modernas y de altísima precisión, respetando estrictos cánones estadísticos. Sin embargo, como desventaja se debe decir que sólo fueron comprobados en una única línea celular; lo que limita los alcances de estos hallazgos. Por otra parte, es importante recordar que se utilizaron proteínas recombinantes en lugar de sus variantes plasmáticas purificadas. Si bien tanto en los experimentos celulares como en los biofísicos se utilizaron proteínas de alta pureza (>95%), es importante mencionar que la misma se calculó por densitometría sobre imágenes de los geles de poliacrilamida; dejando de lado así, cualquier contaminante no proteico. En el mismo

sentido se puede pensar los efectos reportados por apoA-I fisiológica sobre estudios *in vitro*, puede acarrear contaminantes plasmáticos que podrían alterar los resultados.

## **5.5. Coincidencias y discrepancias en respuesta celular frente a Wt y K107del**

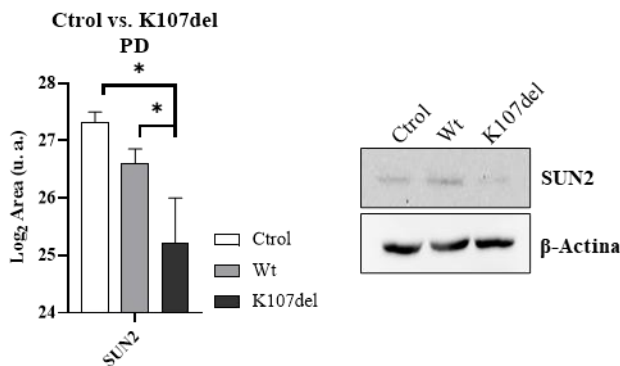
Resulta esperable que tanto Wt como K107del generen la sobreexpresión de las mismas proteínas robustas. Esta observación es afín con la hipótesis de que K107del no acarrea *per sé* consecuencias funcionales como se demostró en sistemas biofísicos mediante análisis *in vitro* con lipoproteínas plasmáticas y se consolida en análisis celulares con macrófagos THP-1. Finalmente, los análisis por Western blot confirman estos hallazgos, así la lista de 9\* proteínas que las células sobreexpresan a partir del tratamiento con Wt y K107del surgen como candidatas a una mayor exploración en su rol metabólico frente al tratamiento con estas apolipoproteínas. Posiblemente, no todas ellas respondan necesariamente a esta lógica, para discernir las respuestas inespecíficas se dispone de apoA-IV recombinante (generosamente donada por el laboratorio del Dr. W. Sean Davidson) con el fin de repetir los ensayos al menos a nivel del Western blot en busca de respuestas inespecíficas utilizando una proteína intercambiable, también recombinante. Lamentablemente por razones de tiempo, no se logró realizar estos estudios hasta el momento.

Dado que estudiar todas las proteínas en profundidad es inviable económica y temporalmente, se utilizó un criterio de selección relativamente arbitrario, pero válido: Sobre las proteínas identificadas solo aquellas con vínculos reportados previamente con el metabolismo lipídico serían las proteínas *target*. Se dio así con los hallazgos de la aparente activación de la vía Nrf2 por parte de apoA-I (resultados que se discutirán más adelante). Sin embargo, por el análisis estadístico de los niveles de expresión mediante PD y MQ se obtuvo valiosa información, ya que en el caso puntal del análisis por PD se hallaron proteínas diferencialmente expresadas en el tratamiento con ambas

---

\*cabe recordar que apoA-I proviene de los tratamientos y no de una sobreexpresión.

variantes. Nuevamente al momento de selección de proteínas se dejaron de lado las aquellas proteínas que no cumplieron con el criterio de “robustecimiento”. De todas maneras, se decidió analizar SUN2 ya que es una de las proteínas que mayor diferencia estadística presentó entre Wt y K107del, y concordantemente, los niveles de expresión detectados por Western blot fueron coincidentes a los informados por el PD como se muestra en la figura 5.2. Esto da cuenta de la importancia que representa continuar estos análisis a futuro, posiblemente teniendo en cuenta también aquellas proteínas no robustas.



**Figura 5.2. Niveles de expresión de SUN2 determinados por PD y validado por Western blot.** Las imágenes muestran los niveles de expresión de SUN2, una de las proteínas reportadas con niveles diferenciales de expresión entre Wt y K107del por PD. Estos resultados se validaron por Western blot confirmando los hallazgos obtenidos mediante LC-MS Orbitrap.

Por otra parte, las proteínas CD44, Mx1, EHD-1, ICAM-1, HO-1, p62, IFIT-1, MMP-9 y RRS1 no están vinculadas entre sí por una única vía metabólica, ni pueden establecerse relaciones entre ellas fácilmente. Estas proteínas no tienen roles preponderantes en el metabolismo lipídico, ni puede explicarse el vínculo con la incubación con apoA-I, por el momento. Sin embargo, como ya se mencionó, p62 fue seleccionada por formar parte de un nodo con MMP-9 y HO-1. A su vez, p62 se reportó en trabajos recientes como proteína target para el tratamiento contra la aterosclerosis, haciéndola sumamente interesante en el marco de estos resultados [77].

## **5.6. Posible implicancia fisiológica de las proteínas robustas y relevancia del nodo p62, MMP-9, HO-1**

Para analizar la importancia del nodo vinculado al rol fisiológico de apoA-I como proteína antiaterogénica, se revisó la bibliografía en vistas del posible vínculo entre estas proteínas y la condición patológica. Para ello se decidió investigar reportes previos de modelos *in vivo* respecto a la sobreexpresión o el *knock out* de dichas proteínas. Típicamente se utiliza como modelo de aterosclerosis *in vivo*, a ratones mutantes apoE<sup>-/-</sup> alimentados con dietas ricas en colesterol (1.25%) y grasas (21%) [78]; ya que como es sabido, los ratones no desarrollan placa ateromatosa *per sé*. Sólo ratones *knockeados* para apoE, son capaces de formar placa ateromatosa alimentados con esta dieta. Interesantemente se encontró que algunos grupos estudiaron estas proteínas en el contexto de ratones apoE<sup>-/-</sup>. Así, Sergin *et al.* 2016 comprobaron que para ratones doble mutantes apoE<sup>-/-</sup> y p62<sup>-/-</sup> la placa aterosclerótica en la aorta aumenta significativamente su tamaño y complejidad atribuyendo este resultado a la deficiencia de p62, otorgándole un rol ateroprotector a esta proteína [79]. En el mismo sentido Yet *et al.* 2003 reportaron resultados similares para ratones doble mutantes APOE<sup>-/-</sup> y HO-1<sup>-/-</sup> concluyendo que la deficiencia de HO-1 genera un aumento significativo en el tamaño y complejidad de la placa ateromatosa desarrollada en estos ratones [80]. En conjunto con estos resultados Wu *et al.* 2011 revisaron el rol de HO-1 en la enfermedad cardiovascular -entre ellas la aterosclerosis-, concluyendo que esta enzima posee un potente rol antiinflamatorio y antioxidante, planteando así su potencial como target terapéutico para el tratamiento de la aterosclerosis [81]. En concordancia con estos reportes, la interpretación del nodo p62 reportado en esta tesis se profundiza al analizar los reportes de Johnson *et al.* 2005 [82]. En estos estudios trabajando nuevamente con ratones doble mutantes apoE<sup>-/-</sup> y MMP-9<sup>-/-</sup>, los autores determinan que el desarrollo de placa ateromatosa aumenta en tamaño y se vuelve más compleja, a consecuencia de la ausencia de la MMP-9 comparativamente con aquella desarrollada por ratones APOE<sup>-/-</sup> MMP-9<sup>+/+</sup>. La misma observación realizaron sobre otra metaloproteinasas de matriz (MMP) la MMP-3. La relevancia de las MMP viene dada por la capacidad de desestabilización de la placa por ruptura de las lesiones ateroscleróticas, pudiendo repercutir en trombosis. En cambio, para el caso de las MMP-3 y MMP-9 los autores atribuyen roles ateroprotector proponiendo que estas proteinasas limitan el crecimiento de la placa. Lamentablemente en la literatura también se encuentran reportes contradictorios a los mencionados. Por

ejemplo, Zhou *et al.* 2016; demostraron que al incubar macrófagos THP-1 con altos niveles de oxLDL aumenta los niveles de p62 al bloquearse la autofagia, acarreado como consecuencia el aumento en la expresión de MMP-9. Liang y Guan 2017 estudiaron los resultados controversiales sobre p62 y su rol dual en el desarrollo aterosclerótico, concluyendo que se trata de una proteína blanco interesante para el desarrollo de tratamientos direccionados a regular la actividad de p62 en el futuro [77][83].

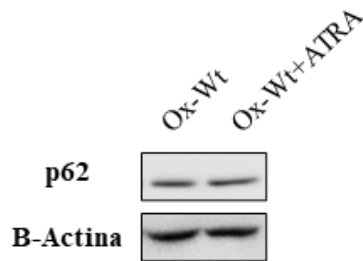
En su conjunto, los niveles de expresión de proteínas no son parámetro suficiente para comprender si éstos son *causa* o *consecuencia* de una condición patológica. Sin embargo, cabe mencionar que no se trabajó con un modelo de macrófagos ateroscleróticos (*foam cells*) sino, que se decidió estudiar el sistema basal (macrófagos THP-1 sin encontrarse “precargados” con lípidos). Así, la sobreexpresión de proteínas a partir del tratamiento con apoA-I podría considerarse como un mecanismo protector que es propio de la proteína ante el eventual proceso aterosclerótico. También, la concentración utilizada en los experimentos celulares es similar a la plasmática, por lo que la sobreexpresión de las proteínas reportadas podría considerarse dentro del marco fisiológico. De todas formas, cabe mencionar que no es conocida la concentración sublocalizada de apoA-I en el entorno microscópico de la túnica íntima, donde tiene lugar la nucleación aterosclerótica. Estas razones llevan a preguntarse si los efectos observados en este trabajo de tesis pueden o no extrapolarse adecuadamente a la condición patológica.

## **5.7. Acumulación de p62 de manera dependiente a la vía Nrf2, a partir del tratamiento con Wt pero no con K107del.**

Con basamento en los resultados obtenidos con coincubaciones de las variantes recombinantes con ATRA, es posible concluir que existe una dependencia de los niveles de p62 expresados y la inhibición de la vía Nrf2. Estos resultados son contundentes

considerando que los niveles fueron determinados a partir de cuatro experimentos independientes utilizando un total de once réplicas experimentales. En el mismo sentido, con tres experimentos y siete replicas se puede determinar que, en cambio K107del acumula p62, pero de manera independiente a Nrf2. Por otra parte, p62 puede pensarse como una encrucijada de señalización ya que es confluencia y punto de partida de diferentes vías como Nrf2, TRAF6, aPKC, mTORC1, etc. Esta realidad hace difícil determinar en qué grado la acumulación de p62 es generada vía Nrf2 exclusivamente; sin embargo, al inhibir esta vía se constató que en incubaciones con la Wt los niveles de p62 decrecen entre un 20-40%. Aunque podría parecer controvertido que Wt y K107del tengan capacidad de acumular p62 de manera dependiente o independiente a Nrf2 respectivamente; un ensayo preliminar utilizando el modelo Wt y oxWt arrojó resultados similares, como se muestra en la figura 5.3. discusión. Estas observaciones consolidan la hipótesis de que la Wt únicamente es capaz de activar la vía Nrf2 y que si la proteína se encuentra dañada (oxidación) o alterada (delección de K107), la activación de la vía puede fallar. Al momento no se encontraron reportes previos que vinculen a esta vía Nrf2-Keap1 con la apoA-I. Por ese motivo se llevaron a cabo controles con apoA-I plasmática y no presentaron aumentos en los niveles de p62. Con estas consideraciones se presentan dos posibilidades: o bien los resultados presentados de los estudios celulares pueden ser artefactos propios del modelo utilizado (proteínas recombinantes); o bien se requieren un mayor número controles para determinar la veracidad de los reportes. Particularmente se puede optar por la segunda opción ya que solamente se utilizó un único lote de apoA-I plasmática realizando una única replica de un único experimento como control. Y, cabe aclarar que la apoA-I plasmática puede llevar consigo contaminantes proteicos, lipídicos o de otra índole que repercutan en efectos “beneficiosos” para este control. Sin embargo, como se mencionó al principio, el mismo criterio aplica a la Wt y K107del ya que podrían arrastrar contaminantes no proteicos. Para resolver esta disyuntiva, resta repetir estos ensayos utilizando apoA-IV recombinante y apoA-I plasmática como controles. Fuera de toda controversia, al menos con el modelo recombinante los resultados son sólidos ya que se demostraron utilizando distintos lotes de proteínas, purificados mediante diferentes métodos y por

diferentes operarios. A la vez se ensayaron diferentes tiempos 4, 12 y 20hs y concentraciones de 1 y 30  $\mu\text{g/ml}$ , obteniendo resultados repetitivos.



**Figura 5.3. Niveles de expresión de p62 luego de incubar los macrófagos THP-1 con oxWt.** Las imágenes muestran los niveles de expresión de p62 de un único experimento luego de realizar tratar los macrófagos por 12 horas con oxWt 30 mg/ml y oxWt 30 mg/ml + ATRA 2  $\mu\text{M}$ . En este experimento preliminar no se parecían diferencias en los niveles de expresión de p62 entre los tratamientos.

Cada sistema de inhibición requiere una puesta a punto, independientemente a que existen dosis de inhibición reportadas, dado que la mayoría de ellos pueden actuar como activadores o inhibidores y en la bibliografía presentan resultados contradictorios, por motivos de pragmatismo se utilizó el inhibidor que funcionó mejor, pero a la vez con reportes previos en la misma línea celular [61].

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

### 6.1. CONCLUSIONES PARCIALES

- 1) La delección de la lisina 107 en apoA-I no genera alteraciones funcionales en su interacción con lípidos puros o lipoproteínas plasmáticas (al menos *in vitro*).
- 2) La delección de K107del en apoA-I provoca alteraciones estructurales a nivel estructural terciario presentando patrones de entrecruzamiento de lisinas diferenciales a la Wt.
- 3) Las alteraciones estructurales terciarias asociadas a la delección de K107 en apoA-I alteran su equilibrio de autoasociación; haciéndola menos propensa a oligomerizar.
- 4) Wt y K107del tienen la capacidad de inducir la sobreexpresión de al menos 9 proteínas: CD44, Mx1, EHD-1, ICAM-1, HO-1, p62, IFIT-1, MMP-9 y RRS1 en macrófagos THP-1.
- 5) Wt acumula la proteína multifuncional p62 de manera dependiente a la vía Nrf2. En cambio, K107del acumula p62, de manera independiente a la vía Nrf2.

### 6.2. CONCLUSIÓN GENERAL:

K107del no presenta *per sé* alteraciones funcionales en sus propiedades biofísicas, en cambio presenta una estructura terciaria alterada respecto a la Wt, que podría explicar parte de sus efectos fisiopatológicos en los portadores heterocigotas de esta mutante de delección. Por otra parte, la delección de la lisina 107 modifica el equilibrio de autoasociación de la proteína haciéndola más propensa a encontrarse en su estado monomérico. En tanto los efectos en células humanas, K107del podría presentar una respuesta celular alterada respecto a la Wt en macrófagos THP-1. Frente al tratamiento con Wt y K107del los macrófagos sobreexpresan proteínas de manera equivalente en ambos tratamientos, sin embargo, solo Wt acumula la proteína p62 de manera dependiente a la vía Nrf2-Keap1.



Por lo tanto, la mutante de delección apoA-I<sup>K107del</sup> puede explicar sus efectos patológicos por sus alteraciones estructurales, y en la respuesta celular.

### 6.3. PERSPECTIVAS

La primera perspectiva insoslayable es la continuación de los experimentos celulares para confirmar mediante los controles discutidos la activación diferencial por parte de la Wt y la K107del de la vía Nrf2-Keap1. Una vez finalizadas las validaciones pertinentes restará seguir indagando en el vínculo entre esta vía y la función de apoA-I, ya que hasta el momento no se había reportado una relación entre ellas. Este nuevo set experimental involucrará una búsqueda exhaustiva del mecanismo de activación de la vía por parte de la apoA-I para comprender su función normal y de qué manera la afectación de la misma podría corresponder a una situación patológica. Como se propuso en esta tesis, un recorrido clásico experimental podría ser mediante el uso de diversos inhibidores y analizando, por ejemplo, la presencia de Nrf2 en núcleo o citoplasma. Simultáneamente no puede ser descuidado el análisis de las proteínas descubiertas en esta tesis como sobreexpresadas a partir del tratamiento con apoA-I. Tanto aquellas que conforman el nodo p62: HO-1 y MMP-9, como el resto de las proteínas robustas. Es importante considerar que no haber hallado en la bibliografía un vínculo directo entre estas proteínas y el metabolismo lipídico no implica necesariamente que no lo haya. A modo de oxímoron planteando una *perspectiva en retrospectiva* cabe considerar el análisis comparativo entre variantes de apoA-I de interés médico mediante espectrometría de masas Orbitrap proponiendo el uso de controles conformados por apoA-I plasmática para minimizar los posibles resultados engañosos.

Desde mi perspectiva, considero que la evaluación de la K107del en su interacción con lípidos se encuentra relativamente resuelta. No considero necesario continuar estudiando la interacción lipídica de la K107del; al menos con los modelos lipídicos clásicos ya que como se discutió, puede que no haya ninguna alteración significativa en su capacidad para interactuar con lípidos modelo y/o lipoproteínas humanas. Sin

embargo, resulta apasionante el descubrimiento de las alteraciones estructurales ocasionadas por la delección de un único aminoácido. Esto implica tanto la estructura terciaria alterada de la K107del como su capacidad disminuida para oligomerizar como fue detectada con BS<sup>3</sup>. En este momento los resultados de LC-MS provenientes de entrecruzamiento de todos los estados oligoméricos de Wt y K107del se encuentran bajo análisis. Debido a la complejidad y caudal del estudio, lamentablemente no se pudo contar con estos resultados para ser incorporados en esta tesis. Sin embargo, se espera que los resultados de dicho análisis permitirán resolver al menos en parte la importancia de la estructura terciaria en la capacidad de oligomerización. Este tipo de experimentos puede enriquecerse utilizando diversos agentes entrecruzantes para validar los resultados obtenidos o bien para reanalizar estos hallazgos.

En este sentido, es importante concretar diversos experimentos para determinar las perspectivas funcionales de los estadios oligoméricos tanto de la Wt como de la K107del para sistemas biológicos y/o modelos biofísicos. Por ejemplo, incubando los diferentes oligómeros entrecruzados con lipoproteínas plasmáticas o células. Este tipo de estudios no puede dejar de realizarse, considerando que la propensión amiloidogénica de apoA-I<sup>K107del</sup> es una de sus características patológicas.

Desde una perspectiva híbrida entre estructura/función, no puede dejar de pensarse en el análisis mediante cryo-EM de rHDL construidas con ambas variantes nativas y entrecruzadas.

Es de mi particular interés -casi un asunto personal con la K107del- poder construir una hipótesis global que permita asociar los hallazgos estructurales de esta variante iniciados en esta tesis y su aparente patogenicidad en seres humanos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] Gotto A.M. and Jackson R.L., “Structure of plasma lipoproteins,” *Atheroscler. IV*, vol. 28, no. 1, pp. 37–43, 1977, doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-95308-8\\_38](https://doi.org/10.1007/978-3-642-95308-8_38).
- [2] M. R. Diffenderfer and E. J. Schaefer, “The composition and metabolism of large and small LDL,” *Current Opinion in Lipidology*. 2014, doi: 10.1097/MOL.0000000000000067.
- [3] J. L. Breslow *et al.*, “Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I (cDNA library/oligonucleotide probe/M13 sequence analysis/lipoprotein metabolism),” 1982.
- [4] P. Linsel-Nitschke and A. R. Tall, “HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease,” *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005, doi: 10.1038/nrd1658.
- [5] J. A. Glomset, “The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction,” *Journal of Lipid Research*. 1968.
- [6] J. T. Melchior *et al.*, “Apolipoprotein A-II alters the proteome of human lipoproteins and enhances cholesterol efflux from ABCA1,” *J. Lipid Res.*, vol. 58, no. 7, pp. 1374–1385, 2017, doi: 10.1194/jlr.M075382.
- [7] E. Åkerlöf, H. Slotted, Å. Pousette, and H. Jörnvall, “Identification of Apolipoprotein A1 and Immunoglobulin as Components of a Serum Complex That Mediates Activation of Human Sperm Motility,” *Biochemistry*, 1991, doi: 10.1021/bi00101a011.
- [8] O. Meilhac, S. Tanaka, and D. Couret, “High-density lipoproteins are bug scavengers,” *Biomolecules*. 2020, doi: 10.3390/biom10040598.
- [9] S. Lund-Katz and M. C. Phillips, “High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport,” *Subcell. Biochem.*, vol. 51, pp. 183–227,

- Jan. 2010, doi: 10.1007/978-90-481-8622-8\_7.
- [10] J. T. Melchior *et al.*, “A consensus model of human apolipoprotein A-I in its monomeric and lipid-free state,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 24, no. 12, pp. 1093–1099, 2017, doi: 10.1038/nsmb.3501.
- [11] J. P. Segrest *et al.*, “A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein,” *J. Biol. Chem.*, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.45.31755.
- [12] S. Bibow *et al.*, “Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 24, no. 2, pp. 187–193, 2017, doi: 10.1038/nsmb.3345.
- [13] M. Pourmousa, H. D. Song, Y. He, J. W. Heinecke, J. P. Segrest, and R. W. Pastor, “Tertiary structure of apolipoprotein A-I in nascent high-density lipoproteins,” vol. 115, no. 20, 2018, doi: 10.1073/pnas.1721181115.
- [14] X. M. Du *et al.*, “HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export,” *Circ. Res.*, 2015, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305485.
- [15] R. A. G. D. Silva, G. M. Hilliard, J. Fang, S. Macha, and W. S. Davidson, “A three-dimensional molecular model of lipid-free apolipoprotein A-I determined by cross-linking/mass spectrometry and sequence threading,” *Biochemistry*, 2005, doi: 10.1021/bi047717+.
- [16] D. W. Borhani, D. P. Rogers, J. A. Engler, and C. G. Brouillette, “Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.23.12291.
- [17] Y. He *et al.*, “Dimers in Human High-density Lipoprotein Authors Antiparallel Dimers in Human High-density,” no. May, pp. 854–864, 2019, doi: 10.1074/mcp.RA118.000878.
- [18] A. L. Cooke *et al.*, “A Thumbwheel Mechanism for APOA1 Activation of LCAT

Activity in HDL.”

- [19] Guid. Franceschini, C. R. Sirtori, C. E. Grossi Paoletti, K. H. Weisgraber, and R. W. Mahley, “A-IMilano Apoprotein decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an italian family”. 1980 Nov;66(5):892-900. doi: 10.1172/JCI109956
- [20] J. R. Nofer *et al.*, “Screening for naturally occurring apolipoprotein A-I variants: apo A-I( $\Delta$ K107) is associated with low HDL-cholesterol levels in men but not in women,” *Hum. Genet.*, vol. 96, no. 2, pp. 177–82, 1995, doi: 10.1007/BF00207375.
- [21] S. C. Rall *et al.*, “Abnormal lecithin: cholesterol acyltransferase activation by a human apolipoprotein A-I variant in which a single lysine residue is deleted,” *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 16, pp. 10063–10070, 1984.
- [22] J. B. Chem and J. A. Thromb, “Identification of Two Apolipoprotein Variants , A-I Kaho ( Asp 51Val ) A-I Lys 107 Deletion and,” vol. 3, no. 1.
- [23] M. Tilly-Kiesi *et al.*, “ApoA-I(Helsinki) (Lys107 $\rightarrow$ 0) associated with reduced HDL cholesterol and LpA-I:A-II deficiency,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 1294–1306, 1995, doi: 10.1161/01.ATV.15.9.1294.
- [24] M. Tilly-Kiesi *et al.*, “Subjects with ApoA-I(Lys107 $\rightarrow$ 0) exhibit enhanced fractional catabolic rate of ApoA-I in Lp(AI) and ApoA-II in Lp(AI with AII),” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 17, no. 5. pp. 873–880, 1997, doi: 10.1161/01.ATV.17.5.873.
- [25] M. Tilly-Kiesi, a. H. Lichtenstein, J. Rintarahko, and M. R. Taskinen, “Postprandial responses of plasma lipids and lipoproteins in subjects with apoA-I(Lys107 $\rightarrow$ 0),” *Atherosclerosis*, vol. 137, no. 1, pp. 37–47, 1998, doi: 10.1016/S0021-9150(97)00250-5.
- [26] S. Ljunggren *et al.*, “ApoA-I mutations, L202P and K131del, in HDL from heterozygotes with low HDL-C,” *Proteomics - Clin. Appl.*, vol. 8, no. 3–4, pp.

- 241–250, 2014, doi: 10.1002/prca.201300014.
- [27] I. N. Gorshkova, X. Mei, and D. Atkinson, “Binding of human apoA-I[K107del] variant to TG-rich particles: implications for mechanisms underlying hypertriglyceridemia,” *J. Lipid Res.*, vol. 55, no. 9, pp. 1876–1885, 2014, doi: 10.1194/jlr.M047241.
- [28] W. Huang *et al.*, “Recombinant proapoA-I(Lys107del) shows impaired lipid binding associated with reduced binding to plasma high density lipoprotein,” *Atherosclerosis*, vol. 159, no. 1, pp. 85–91, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0021-9150(01)00496-8.
- [29] I. N. Gorshkova, X. Mei, and D. Atkinson, “Binding of human apoA-I[K107del] variant to TG-rich particles: Implications for mechanisms underlying hypertriglyceridemia,” *J. Lipid Res.*, vol. 55, no. 9, pp. 1876–1885, 2014, doi: 10.1194/jlr.M047241.
- [30] A. Jonas, A. Von Eckardstein, K. E. Kezdy, A. Steinmetz, and G. Assmann, “Structural and functional properties of reconstituted high density lipoprotein discs prepared with six apolipoprotein A-I variants,” *J. Lipid Res.*, vol. 32, no. 1, pp. 97–106, 1991.
- [31] N. A. Ramella *et al.*, “Human Apolipoprotein A-I Natural Variants: Molecular Mechanisms Underlying Amyloidogenic Propensity,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0043755.
- [32] J. D. Toledo *et al.*, “Apolipoprotein A-I Helsinki promotes intracellular acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) protein accumulation,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 377, no. 1–2, pp. 197–205, May 2013, doi: 10.1007/s11010-013-1585-y.
- [33] J. W. Heinecke, “The not-so-simple HDL story: A new era for quantifying HDL and cardiovascular risk?,” *Nat. Med.*, vol. 18, no. 9, pp. 1346–7, 2012, doi: 10.1038/nm.2930.
- [34] M. Guerin, *Reverse Cholesterol Transport in HDL Metabolism: Relevance to Atherosclerosis Progression and Cardiovascular Diseases*, Third Edit. Elsevier

- Inc., 2017.
- [35] J. D. Furtado *et al.*, “Distinct Proteomic Signatures in 16 HDL (High-Density Lipoprotein) Subspecies,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2018, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311607.
- [36] K. C. Vickers, B. T. Palmisano, B. M. Shoucri, R. D. Shamburek, and A. T. Remaley, “MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 423–435, 2011, doi: 10.1038/ncb2210.
- [37] F. Tabet *et al.*, “HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3292, 2014, doi: 10.1038/ncomms4292.
- [38] P. Libby *et al.*, “Atherosclerosis,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0106-z.
- [39] R. D. Santos *et al.*, “Characterization of high density lipoprotein particles in familial apolipoprotein A-I deficiency,” *J. Lipid Res.*, 2008, doi: 10.1194/jlr.M700362-JLR200.
- [40] M. L. Posadas-martínez, A. Aguirre, M. Blomberg, and G. Greloni, “Amiloidosis , una enfermedad huérfana : creación de un registro institucional de amiloidosis,” *ev. Hosp. Ital. B.Aires*, vol. 33, no. January, pp. 164–166, 2013.
- [41] M. Amarzguioui *et al.*, “Extensive intimal apolipoprotein A1-derived amyloid deposits in a patient with an apolipoprotein A1 mutation,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 242, no. 3, pp. 534–539, Jan. 1998, doi: 10.1006/bbrc.1997.8005.
- [42] S. M. Gordon, S. Hofmann, D. S. Askew, and W. S. Davidson, “High density lipoprotein: It’s not just about lipid transport anymore,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2011, doi: 10.1016/j.tem.2010.10.001.
- [43] G. W. Cockerill, K. A. Rye, J. R. Gamble, M. A. Vadas, and P. J. Barter, “High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1995, doi:

10.1161/01.ATV.15.11.1987.

- [44] S. Patel *et al.*, “Anti-inflammatory effects of apolipoprotein A-I in the rabbit,” *Atherosclerosis*, 2010, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.035.
- [45] A. R. Tall and L. Yvan-Charvet, “Cholesterol, inflammation and innate immunity,” *Nature Reviews Immunology*. 2015, doi: 10.1038/nri3793.
- [46] A. J. Iqbal *et al.*, “Acute exposure to apolipoprotein a1 inhibits macrophage chemotaxis in vitro and monocyte recruitment in vivo,” *Elife*, 2016, doi: 10.7554/eLife.15190.
- [47] N. Vuilleumier, J. M. Dayer, A. Von Eckardstein, and P. Roux-Lombard, “Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in high-density lipoproteins?,” *Swiss Medical Weekly*. 2013, doi: 10.4414/smw.2013.13781.
- [48] X. Cao *et al.*, “Cholesterol: A new game player accelerating endothelial injuries caused by SARS-CoV-2?,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2020.
- [49] C. Bruzzone *et al.*, “SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum,” *iScience*, 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101645.
- [50] O. Miyazaki, J. Ogihara, I. Fukamachi, and T. Kasumi, “Evidence for the presence of lipid-free monomolecular apolipoprotein A-1 in plasma,” vol. 55, 2014, doi: 10.1194/jlr.M041038.
- [51] A. Chroni, T. Liu, M. L. Fitzgerald, M. W. Freeman, and V. I. Zannis, “Cross-Linking and Lipid Efflux Properties of ApoA-I Mutants Suggest Direct Association between ApoA-I Helices and ABCA1 †,” pp. 2126–2139, 2004.
- [52] H. Qian, X. Zhao, P. Cao, J. Lei, N. Yan, and X. Gong, “Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1 Article Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1,” *Cell*, vol. 169, no. 7, pp. 1228-1239.e10, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.020.
- [53] K. Nagao, Y. Kimura, and K. Ueda, “Lysine residues of ABCA1 are required for the interaction with apoA-I,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 2012, doi: 10.1016/j.bbalip.2011.06.024.



- [54] M. Liu, X. Mei, H. Herscovitz, and D. Atkinson, "N-terminal mutation of apoA-I and interaction with ABCA1 reveal mechanisms of nascent HDL biogenesis," vol. 60, pp. 0–2, 2019, doi: 10.1194/jlr.M084376.
- [55] Y. Azuma, M. Takada, H.-W. Shin, N. Kioka, K. Nakayama, and K. Ueda, "Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation.," *Genes Cells*, vol. 14, no. 2, pp. 191–204, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01261.x.
- [56] G.-J. Zhao, K. Yin, Y.-C. Fu, and C.-K. Tang, "The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids.," *Mol. Med.*, vol. 18, pp. 149–58, Jan. 2012, doi: 10.2119/molmed.2011.00183.
- [57] Q. Ma, "Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 53, no. 1, pp. 401–426, 2013, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
- [58] M. C. Jaramillo and D. D. Zhang, "The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer," *Genes and Development*. 2013, doi: 10.1101/gad.225680.113.
- [59] A. Lau, S. A. Whitman, M. C. Jaramillo, and D. D. Zhang, "Arsenic-Mediated Activation of the Nrf2-Keap1 Antioxidant Pathway," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2013, doi: 10.1002/jbt.21463.
- [60] J. Zhu *et al.*, "An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 99, pp. 544–556, 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.010.
- [61] M. Valenzuela *et al.*, "Retinoic acid synergizes ATO-mediated cytotoxicity by precluding Nrf2 activity in AML cells," *Br. J. Cancer*, vol. 111, no. 5, pp. 874–882, 2014, doi: 10.1038/bjc.2014.380.
- [62] B. K. Ooi, K. G. Chan, B. H. Goh, and W. H. Yap, "The Role of Natural Products in Targeting Cardiovascular Diseases via Nrf2 Pathway: Novel Molecular

- Mechanisms and Therapeutic Approaches,” *Frontiers in Pharmacology*. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01308.
- [63] U. K. LAEMMLI, “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 228, pp. 726–734, 1970, [Online]. Available: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>.
- [64] E. Catanzaro, C. Calcabrini, E. Turrini, P. Sestili, and C. Fimognari, “Nrf2: a potential therapeutic target for naturally occurring anticancer drugs?,” *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 21, no. 8, pp. 781–793, 2017, doi: 10.1080/14728222.2017.1351549.
- [65] J. Zhu *et al.*, “An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 99, pp. 544–556, 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.010.
- [66] J. Wilschut, N. Düzgüneş, R. Fraley, and D. Papahadjopoulos, “Studies on the Mechanism of Membrane Fusion: Kinetics of Calcium Ion Induced Fusion of Phosphatidylserine Vesicles Followed by a New Assay for Mixing of Aqueous Vesicle Contents,” *Biochemistry*, 1980, doi: 10.1021/bi00567a011.
- [67] A. Tricerri, B. Córscico, J. D. Toledo, H. A. Garda, and R. R. Brenner, “Conformation of apolipoprotein AI in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: Effect of cholesterol,” *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1391, no. 1, pp. 67–78, 1998, doi: 10.1016/S0005-2760(97)00187-2.
- [68] N. A. Ramella *et al.*, “Human apolipoprotein A-I-derived amyloid: Its association with atherosclerosis,” *PLoS One*, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0022532.
- [69] S. A. Rosú *et al.*, “Amyloidogenic propensity of a natural variant of human apolipoprotein A-I: Stability and interaction with ligands,” *PLoS One*, vol. 10, no. 5, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0124946.
- [70] C. E. Matz and A. Jonasf, “Micellar Complexes of Human Apolipoprotein A-I

- with Phosphatidylcholines and Cholesterol Prepared from Cholate-Lipid,” vol. 257, no. 8, pp. 4535–4540, 1982.
- [71] D. K. Swertfeger, S. Rebholz, H. Li, A. S. Shah, W. S. Davidson, and L. J. Lu, “Feasibility of a plasma bioassay to assess oxidative protection of low-density lipoproteins by high-density lipoproteins,” *J. Clin. Lipidol.*, 2018, doi: 10.1016/j.jacl.2018.08.007.
- [72] D. B. Lima *et al.*, “Characterization of homodimer interfaces with cross-linking mass spectrometry and isotopically labeled proteins,” vol. 13, no. 3, pp. 431–458, 2018, doi: 10.1038/nprot.2017.113.
- [73] R. Maget-Dana, “The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes,” 1999. [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/bba](http://www.elsevier.com/locate/bba).
- [74] J. B. S. and B. C. Chang, “Thermal Dependence of Apolipoprotein A-I-Phospholipid Recombination,” *Biochemistry*, vol. 19, no. 1976, pp. 5637–5644, 1980.
- [75] D. Handa *et al.*, “Kinetic and thermodynamic analyses of spontaneous exchange between high-density lipoprotein-bound and lipid-free apolipoprotein A-I,” *Biochemistry*, vol. 54, no. 4, pp. 1123–31, 2015, doi: 10.1021/bi501345j.
- [76] L. B. Vitello and A. M. Scanu, “Studies on human serum high density lipoproteins. Self association of apolipoprotein A I in aqueous solutions,” *J. Biol. Chem.*, 1976, doi: 10.1016/s0021-9258(17)33810-3.
- [77] X. Liang and X. Guan, “p62/SQSTM1: A potential molecular target for treatment of atherosclerosis,” *Front. Lab. Med.*, vol. 1, no. 2, pp. 104–106, 2017, doi: 10.1016/j.flm.2017.06.007.
- [78] S. P. Monsanto, K. J. Hintze, R. E. Ward, D. P. Larson, M. Lefevre, and A. D. Benninghoff, “The new total Western diet for rodents does not induce an overweight phenotype or alter parameters of metabolic syndrome in mice,” *Nutr.*

*Res.*, 2016, doi: 10.1016/j.nutres.2016.06.002.

- [79] I. Sergin *et al.*, “P62-Enriched Inclusion Bodies in Macrophages Protect Against Atherosclerosis,” *Sci. Signal.*, vol. 9, no. 409, p. ra2, 2016, doi: 10.1126/scisignal.aad5614.
- [80] S. F. Yet *et al.*, “Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling,” *FASEB J.*, 2003, doi: 10.1096/fj.03-0187fje.
- [81] M.-L. Wu, Y.-C. Ho, C.-Y. Lin, and S.-F. Yet, “Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease.,” *Am. J. Cardiovasc. Dis.*, vol. 1, no. 2, pp. 150–8, 2011, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254194><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3253502>.
- [82] J. L. Johnson, S. J. George, A. C. Newby, and C. L. Jackson, “Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 43, pp. 15575–15580, 2005, doi: 10.1073/pnas.0506201102.
- [83] F. Zhou, D. Liu, H. F. Ning, X. C. Yu, and X. R. Guan, “The roles of p62/SQSTM1 on regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression in response to oxLDL in atherosclerosis,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 472, no. 3, pp. 451–458, 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.065.

