



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Médicas

Trabajo de Tesis Doctoral

Amiloidosis e inflamación: rol de la apolipoproteína A-I

Tesista: Gisonno, Romina A.

Director: Dra. Prof. Tricerri, M. Alejandra

Codirector: Dr. Ramella, Nahuel A.

Año: 2021

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. Tricerri, M. Alejandra y la co-dirección del Dr. Ramella, Nahuel A.

Agradecimientos:

A mis directores de tesis, la Dra. M. Alejandra Tricerri y el Dr. Nahuel Ramella por confiar en mí para formar parte del grupo y realizar este trabajo, por haberme acompañado, estar dispuestos a ayudarme y aconsejarme en todo momento.

Al Director del INIBIOLP, Dr. Horacio Garda, por permitirme realizar este trabajo en el instituto.

Al grupo de trabajo: Gabriela, Fernanda, Silvana, Ivo, Gisela, Tati y Guille por hacer amenas las horas de trabajo, donde compartimos charlas, mates, experiencias.

A Juan Gorgojo, Eugenia Rodríguez, Exequiel Barrera y Tomás Masson por sus colaboraciones que enriquecieron sin dudas este trabajo.

A todos los integrantes del INIBIOLP, que me acompañaron en este trayecto y siempre estuvieron predispuestos a dar una mano.

A la Universidad Nacional de La Plata y CONICET por financiar mi doctorado.

A mi familia. A mis padres que me enseñaron a luchar por mis sueños. A mis hermanos, sin dudas lo mejor de mi vida, por su apoyo y confianza de siempre. A Tomás, mi compañero, siempre incondicional. A Mía y Nina, por alegrar mis días.

Contenido

Abreviaciones.....	6
Resumen	8
Capítulo 1:.....	10
Introducción.....	10
1.1 Apolipoproteína A-I. Estructura y función.....	11
1.2 ApoA-I y amiloidosis.....	18
1.2.1 Definición de amiloide.....	18
1.2.2 Agregación amiloide.....	19
1.2.3 Amiloidosis.....	22
1.2.4 Mutaciones naturales en apoA-I.....	26
1.2.5 Efectos de las modificaciones postraduccionales en la funcionalidad de apoA-I.....	32
1.3 Inflamación, aterosclerosis y apoA-I.....	33
1.3.1 Elementos básicos de la inflamación.....	34
1.3.2 Aterosclerosis.....	35
1.3.3 ApoA-I y su rol dual.....	37
1.4. Hipótesis de trabajo.....	40
Capítulo 2:	41
Restricciones evolutivas y estructurales que influyen en el comportamiento amiloide de la apolipoproteína A-I.....	41
2.1 Resumen	42
2.2 Introducción	43
2.3. Objetivos.....	44
2.3.1. Objetivo general.....	44
2.3.2. Objetivos específicos	44
2.4 Materiales y métodos.....	45
2.4.1 Análisis evolutivo de secuencias de apoA-I.....	45
2.4.2 Modelado estructural comparativo de secuencias existentes de apoA-I.....	45
2.4.3 Conservación de regiones propensas a la agregación (APR).....	46
2.4.4 Impacto termodinámico de las variantes sin sentido de apoA-I.....	47
2.4.5 Puntuación de patogenicidad de variantes de sentido erróneo.....	47
2.4.6 Simulaciones de dinámica molecular	48
2.4.7 Disponibilidad de código y archivos.....	49
2.4.8 Visualizaciones y análisis estadísticos	49
2.5 Resultados	50

2.5.1 Evolución molecular de las regiones de agregación de apoA-I dentro de <i>Sarcopterygii</i>	50
2.5.2 Modelado estructural de secuencias existentes de apoA-I.....	52
2.5.3 Las variantes asociadas a amiloidosis tienen un efecto desestabilizador sobre la estructura del monómero apoA-I.....	55
2.5.4 Simulación de dinámica molecular de mutantes apoA-I	62
2.6 Discusión.....	65
Capítulo 3:	68
El rol de las modificaciones postraduccionales y las variantes naturales en la disfunción de la apolipoproteína A-I humana.....	68
3.1 Resumen	69
3.2 Introducción	70
3. 3. Objetivos.....	71
3. 3. 1. Objetivo general.....	71
3. 2. 1. Objetivos específicos.....	71
3. 4. Materiales y métodos.....	72
3. 4. 1. Materiales.....	72
3. 4. 2. Obtención de apoA-I de tipo salvaje (Wt) y K107del recombinantes.....	72
3. 4. 3. Oxidación y fibrilación de proteínas	74
3. 4. 4. Entrecruzamiento químico de proteínas.....	74
3. 4. 5 Metodologías de interacción proteína/lípidos.....	75
3. 4. 6. Caracterización de la estructura proteica de las proteínas oxidadas.....	75
3. 4. 7. Otros métodos analíticos	77
3. 5 Resultados.....	78
3. 5. 1. Expresión y purificación de proteínas	78
3. 5. 2. Caracterización de las proteínas oxidadas.	79
3. 5. 3. Conformación fibrilar de las proteínas en estudio.....	86
3. 6 Discusión.....	91
Capítulo 4:	96
Capacidad de las variantes pro-amiloidogénicas de apoA-I y sus posibles conformaciones en establecer una respuesta inflamatoria	96
4.1. Resumen	97
4.2. Introducción	98
4. 3. Objetivos	99
4. 3. 1. Objetivo general.....	99
4. 2. 1. Objetivos específicos.....	99
4. 4. Materiales y métodos	100

4. 4. 1. Materiales.....	100
4. 4. 2. Obtención de apoA-I de tipo salvaje (Wt) y K107del recombinantes.....	100
4. 4. 3. Obtención de las conformaciones proteicas de apoA-I	100
4. 4. 4. Activación de respuesta pro-inflamatoria mediada por variantes de apoA-I en THP-1.....	100
4. 4. 5. Estudio de la citotoxicidad y expresión de moléculas de adhesión causada por las variantes de apoA-I en células endoteliales humanas.....	102
4. 4. 6. Estudios formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)...	103
4. 4. 7. Análisis estadístico.....	104
4. 5 Resultados.....	105
4. 5. 1 Toxicidad y activación de respuesta pro-inflamatoria mediada por variantes de apoA-I en macrófagos humanos.	105
4. 5. 2. Influencia de variantes de apoA-I sobre la relación viabilidad-citotoxicidad de células endoteliales microvasculares.....	107
4. 5. 3. Expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales mediada por variantes de apoA-I.	108
4. 5. 4 Inducción de NETosis por estructuras apoA-I	111
4. 6 Discusión.....	112
Capítulo 5:	118
Discusión general y perspectivas futuras.	118
6. Anexo	124
Fundamentos y métodos generales.....	124
Entrecruzado (“crosslinking”) de proteínas.	125
Ensayos de fluorescencia.....	126
Utilización de sondas	128
Microscopía.	130
Dicroísmo circular (CD)	131
Medios de Cultivo:.....	132
Electroforesis de proteínas.....	133
Western blot.....	134
Ensayos de viabilidad celular.....	135
Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)	135
Bibliografía	137

Abreviaciones

(f)	Estructura fibrilar
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ApoA-I	Apolipoproteína A-I humana
Bis-ANS	Ácido 4,4'-Dianilino-1,1'-Binaftil-5,5'-Disulfónico
BS₃	Bis(sulfosuccinimidil)suberato
CE	Ésteres de colesterol
DCFDA	2',7'-diclorofluoresceína-diacetato
DMPC	Di- miristoil fosfatidil colina
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
ECV	Enfermedad cardiovascular
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelulares
IL-1	Interleuquina 1
IPTG	Isopropil tio galactósido
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
K107del	Mutante de delección de apoA-I recombinante
LCAT	Lecitina colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LUV	Liposomas unilamelares grandes
MD	Dinámica Molecular
MEC	Matriz extracelular

MLV	Liposomas multilamelares
MMP	Metaloproteinasas
nHDL	Lipoproteínas de alta densidad nacientes
ON	Toda la noche
ox-	Prefijo que indica oxidación
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMC	Células polimorfo nucleares
PTM	Modificaciones post traduccionales
r.p.m.	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio de cultivo RPMI 1640
SUV	Liposomas unilamelares pequeños
ThT	Tioflavina - T
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alpa
TRC	Transporte reverso de colesterol
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano
TTR	Transtiretina
VCAM-1	Moléculas de adhesión vascular

Resumen

Durante este trabajo de tesis nos abocamos en comprender la fisiopatología de las amiloidosis causadas por la apolipoproteína A-I (apoA-I). Como la proteína mayoritaria de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), la apoA-I, está involucrada en funciones relacionadas con el transporte reverso de colesterol (TRC) y con la protección contra las enfermedades cardiovasculares (ECV), pero también puede modular las respuestas inflamatorias e inmunes. Dada la estabilidad marginal de una proteína flexible como es apoA-I y sus múltiples funciones, su conformación nativa puede verse involucrada en procesos que la desestabilizan provocando su agregación. Así, el depósito patológico de esta proteína induce el desarrollo de enfermedades crónicas conocidas como amiloidosis. En el caso de las amiloidosis debida a apoA-I, existe muy poca información científica que nos permita entender las razones involucradas dan lugar a una conformación patológica, ya sea con su secuencia nativa o con alteraciones en composición de aminoácidos.

En la primera parte de este trabajo nos dedicamos al estudio *in silico* de apoA-I y algunas de sus variantes amiloidogénicas con el fin de obtener información clave para el entendimiento del mecanismo por el cual la proteína pierde sus funciones y pasa a formar parte de agregados amiloides. Obtuvimos importante información acerca de parámetros estructurales y proponemos un mecanismo de agregación para una de las variantes naturales de apoA-I. A pesar de ello, de nuestros análisis se sugiere que las mutaciones no parecen inducir un colapso importante en la estructura proteica que pueda justificar de manera evidente su agregación patológica, por lo que podría ser requerido un procesamiento proteico drástico en el microambiente, probablemente debido a modificaciones postraduccionales crónicas y progresivas, como son las oxidaciones, para inducir un colapso de la estructura proteica.

En base a esta hipótesis planteada nos surgió la siguiente pregunta: ¿Existe una relación estrecha entre la amiloidosis, la aterosclerosis y la inflamación, que involucra a la apoA-I en su secuencia nativa? La amiloidosis por apoA-I no hereditaria se caracteriza por depósitos de proteína salvaje (Wt) en placas ateroscleróticas. Estos hallazgos, tomados junto con estudios *in vitro* que muestran que la oxidación de apoA-I Wt promueve la formación de fibrillas amiloides, nos permiten sugerir un vínculo entre la oxidación local de apoA-I y el aumento del potencial amiloidogénico. Con el objetivo de analizar el rol de la inflamación en este proceso, utilizamos la única variante natural amiloidogénica conocida asociada a aterosclerosis severa, la apoA-I K107del. Es de nuestro particular interés, y objetivo de este trabajo de tesis, indagar en el impacto de la

oxidación, como modificación postraducciona, que podría afectar la estructura y la función de apoA-I.

Por primera vez, logramos la formación de estructuras fibrilares características en apoA-I K107 del representativas a las identificadas en lesiones de pacientes. Empleamos herramientas biofísicas ampliamente reconocidas para caracterizar el impacto estructural y funcional de la oxidación en las proteínas en estudio. Bajo la hipótesis de que un cambio en la conformación de la proteína hacia una especie fibrilar puede inducir, no sólo el deterioro en su función, sino además producir una especie citotóxica que empeore el escenario proinflamatorio, utilizamos distintos modelos celulares humanos para intentar comprender si la apoA-I en sus diferentes conformaciones podría iniciar un proceso inflamatorio en un microambiente complejo como es el de la microvasculatura.

Como conclusión de este trabajo, proponemos que existe un posible mecanismo capaz de perpetuar la lesión amiloide, con fuertes indicios de un proceso que se retroalimenta positivamente, y que podría explicar la estrecha relación entre la amiloidosis asociada a apoA-I y la aterosclerosis.

Capítulo 1:

Introducción

1.1 Apolipoproteína A-I. Estructura y función.

La apolipoproteína A-I es el principal componente proteico de las partículas de HDL y representa aproximadamente el 70% de la masa proteica de esta lipoproteína (Bashtovyy y col. 2011). Es la apolipoproteína más abundante en los seres humanos, con una alta concentración de plasma de aproximadamente 130 mg/dl (45 mM) (Leman y col. 2014). En las partículas de HDL, la apoA-I cumple funciones claves, especialmente en el transporte al hígado del exceso de colesterol circulante, proceso conocido como transporte reverso de colesterol (TRC) (Leman y col. 2014).

La apoA-I humana madura de 28 kDa, contiene 243 aminoácidos codificados por el exón 3 (residuos de 1 al 43) y el exón 4 (residuos 44-243) del gen APOA1 localizado en el brazo largo del cromosoma 11. Inicialmente la secuencia de aminoácidos cuenta con un pre-pro-péptido de 24 residuos, una vez que el péptido señal de 18 aminoácidos es clivado, la proteína es secretada al plasma donde, por la acción de metaloproteasas, se remueven los 6 residuos restantes para dar lugar a la proteína madura (Obici y col. 2006). Estas secuencias están representadas en la Figura 1.1.

-24	-6	
MKAAVLT	LAVLFLTGSQ	ARHFWQQ 0
DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDS		25
GRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNW		50
DSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNL		75
EKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPY		100
LDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAE		125
LQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRD		150
RARAHVDALRTHLAPYSDELQRQLA		175
ARLEALKENGGARLAEYHAKATEHL		200
STLSEKAKPAEDLRQGLLPVLESF		225
KVSFLSALEEYTKKLNTQ		243

Figura 1.1. Secuencia de prepro apoA-I. Contiene el péptido señal de 18 residuos (verde), un linker de 6 residuos (rojo) y el péptido apoA-I de 243 residuos (negro).

En circulación la apoA-I puede existir en estado libre o formando parte de las HDL con diversa cantidad de lípidos y otras proteínas, en conformaciones discoidales (de vida media corta en circulación) y esféricas (Davidson y Thompson 2007). A fin de llevar a cabo sus funciones, la estructura de esta proteína es altamente flexible y adaptable. Las propiedades termodinámicas de desplegado de apoA-I libre de lípidos son

distintas a las proteínas globulares típicas. En ensayos de desnaturalización térmica de apoA-I se estimó que la energía libre de estabilización ΔG° es de aproximadamente 2,4 kcal/mol comparado a las 5-15 kcal/mol, típico de las proteínas globulares (Gursky y Atkinson 1996). Se demostró además por dicroísmo circular que apoA-I libre posee propiedades identificables con el estado de “glóbulo fundido” definido como un plegamiento compacto intermedio, de estructura terciaria laxa con una estructura secundaria bien definida (Freire 1995).

En estado libre de lípidos, el ~60 % de la estructura secundaria de la apoA-I está organizada en α -hélices, mientras que el dominio N-terminal (aminoácidos 1 hasta el 43) está compuesto por secuencias que determinan regiones cortas con estructura de hoja- β y otras desorganizadas. Entre los aminoácidos 8-33 se predice una hélice de tipo G, con una distribución aleatoria de residuos positivos y negativos en la cara polar (Figura 1.2). A partir del aminoácido 44, la secuencia de la apoA-I humana contiene dos segmentos de 11 residuos y ocho segmentos de 22, cada uno de los cuales ha surgido de la duplicación en tándem de dos subunidades de 11 residuos. Las subunidades repetitivas de 11 mer se han racionalizado sobre la base de 3,6 aminoácidos por vuelta en una hélice α estándar, ya que 11 residuos completan tres vueltas. De la misma manera, la duplicación en tándem a subunidades de 22 unidades proporciona seis giros helicoidales completos con poca torsión entre las hélices adyacentes. Los segmentos helicoidales son anfipáticos ya que se delimita una cara hidrófila y una cara hidrófoba (Brouillette y col. 2001). Suelen ser interrumpidos por una prolina (Pro), lo que se cree que permite la flexibilidad conformacional necesaria para llevar a cabo las múltiples funciones de esta proteína, en un proceso dinámico involucrando la formación de partículas de HDL (Segrest y col. 1992). La mayor parte de la estructura de dichas hélices anfipáticas es descrita como de tipo “A”, caracterizada por la presencia de residuos básicos cerca de la superficie hidrofóbica/hidrofílica y residuos ácidos en el centro de la cara polar; esa estructura la presentan las regiones 44-65, 66-87, 121-142, 143-164, 165-186 y 187-208. Finalmente, se reconocen hélices de clase Y, caracterizadas por la presencia de tres clusters de residuos básicos en la cara polar que la presentan las regiones 88-98, 99-120, 209-219 y 220-241 (Obici y col. 2006; Oda 2017; Segrest y col. 1992).

La fuerte interacción entre apoA-I y fosfolípidos es promovida por las estructuras de hélice α en apoA-I (Brouillette y col. 2001). Estas hélices se estabilizan por contacto consigo mismas y/o con lípidos, y la estructura de la apoA-I asociada a lípidos en las partículas HDL discoidales o esféricas refleja dichas interacciones estabilizadoras (Leman y col. 2014).

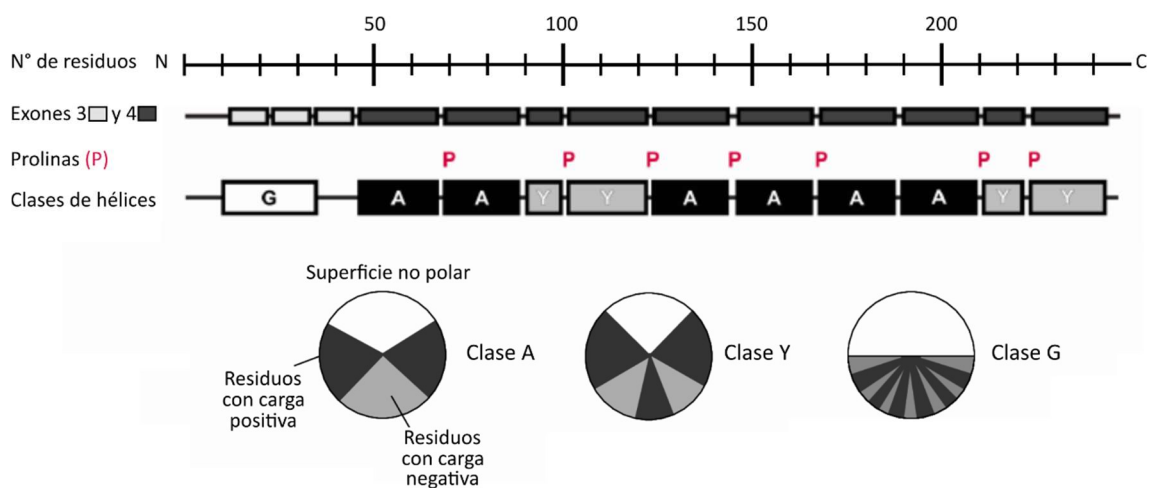


Figura 1.2. Mapa de estructura secundaria predicha de apoA-I sin lípidos. El conjunto superior de recuadros representa los segmentos 11 y 22 mers predichos, los recuadros de color gris claro son regiones codificadas por el exón 3, mientras que los recuadros negros están codificados por el exón 4. El segundo conjunto de recuadros representa los segmentos helicoidales alfa pronosticados con la clase indicada como A, G, o Y. Debajo, la disposición de residuos cargados no polares, positivos y negativos para las hélices de clase A, Y y G, adaptado de Oda 2017.

Las interacciones terciarias que estabilizan las α -hélices son muy débiles, dando lugar a una elevada plasticidad conformacional que le permite a esta proteína adoptar distintas conformaciones al momento de interactuar con sus distintos ligandos (Gursky y Atkinson 1996; Obici y col. 2006). Esta estructura está definida por dos dominios: un haz helicoidal N-terminal (residuos 1-180) y un segmento de asociación a lípidos C-terminal menos ordenado (residuos 181-243) (Leman y col. 2014). Los detalles de la estructura terciaria no están completamente definidos debido a que apoA-I no pudo ser cristalizada completa hasta el momento dada su flexibilidad conformacional. Los estudios de difracción de rayos X que se realizaron hasta el día de hoy fueron a partir de fragmentos de apoA-I, pudiendo generarse entonces modelos parciales de la proteína. El modelo mostrado en la Figura 1.3.A 3R2P de Mei y Atkinson, (Mei y Atkinson 2011) se obtuvo a partir de dímeros antiparalelos del extremo C-terminal de la proteína truncada: apoA-I Δ (185–243) con una definición de 2,2 Å (<https://www.rcsb.org/structure/3R2P>). Existe un modelo de la estructura completa, utilizado en este trabajo de tesis, al que se lo denomina “modelo consensuado” (o consenso) de apoA-I monomérica y libre de lípidos, generado por Melchior en el 2017 (Melchior y col. 2017) y mostrado en la Figura 1.3.B. Para la construcción del mismo se utilizaron los datos provenientes de diversas técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), entrecruzamiento con diferentes agentes químicos (cross-linking), 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.

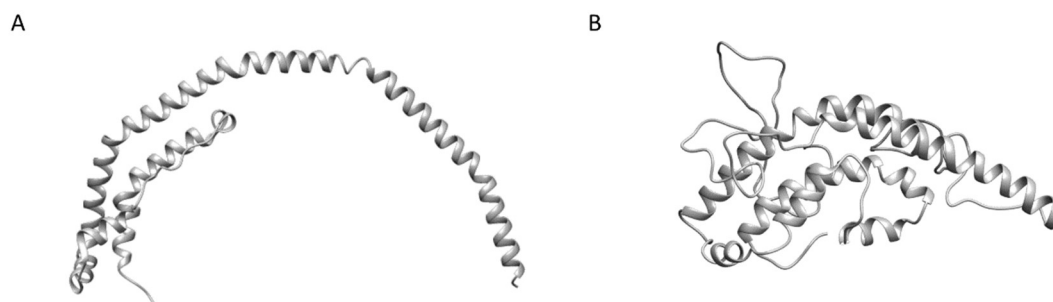


Figura 1.3. Modelos estructurales existentes de apoA-I monomérica y libre de lípidos. En la figura se observa el modelo de apoA-I generado por A) cristalografía de rayos X por Mei y Atkinson, apoA-I Δ (185-243) (<https://www.rcsb.org/structure/3r2p>) y B) el modelo consensuado reportado por Melchior (<https://homepages.uc.edu/~davidswm/structures.html>).

Por otra parte, varios ensayos han tratado de dilucidar cómo se ensambla apoA-I para formar las HDL. Las nanopartículas de HDL son complejos dinámicos altamente heterogéneos, lo que las hace resistentes a la determinación de la estructura por cristalografía de rayos X o RMN. En la actualidad existe gran consenso apoyando un modelo donde las hélices anfipáticas de dos moléculas de apoA-I se disponen en forma de “cinturón” alrededor de una bicapa lipídica en las partículas discoidales (Figura 1.4). Este modelo estructural detallado fue propuesto por Segrest en 1999, en el cual los pares α -helicoidales de apoA-I forman un doble anillo plano alrededor del disco lipídico (Segrest y col. 1999). Los puentes salinos intermoleculares fuertes hacen que las dos proteínas se apilen de manera antiparalela con la superposición por pares de los residuos 121-142 (Hélice 5), produciendo un registro llamado LL5/5. Este registro conduce a una ligera superposición (o registro parcial) de los dominios N-terminales (DTN).

Con el tiempo han surgido otros modelos estructurales más refinados. Aunque todos estos modelos comparten el registro LL5/5 difieren significativamente, especialmente en su descripción de dominios terminales y tienen diferentes implicaciones para el proceso de maduración de las HDL nacientes (Pourmoussa y col. 2018). A través de simulaciones de dinámica molecular de HDL discoidales (o nacientes, nHDL), cada una con dos moléculas de apoA-I, 160 de fosfolípidos y 24 de colesterol o 200 de fosfolípidos y 20 de colesterol, Pourmoussa sugirió que los residuos 1 a 21 de los dominios N-terminal de apoA-I interactúan a través de puentes salinos fuertes. Los

residuos 26–43 de una apoA-I en la partícula más pequeña forman una bisagra en el borde del disco, que desplaza el dominio C-terminal de la otra apoA-I hacia la superficie del fosfolípido. Las estructuras propuestas están respaldadas por cross-linking, modelado de Rosetta del dominio N-terminal, y análisis de la estructura cristalina de $\Delta 185$ de apoA-I sin lípidos (Pourmousa y col. 2018).

El modelo de doble cinturón se convirtió en la visión arraigada de la estructura nHDL (Lund-Katz y Phillips 2010), sin embargo, la conformación general del dímero apoA-I dentro de la partícula aún se debate (Gogonea 2016a).

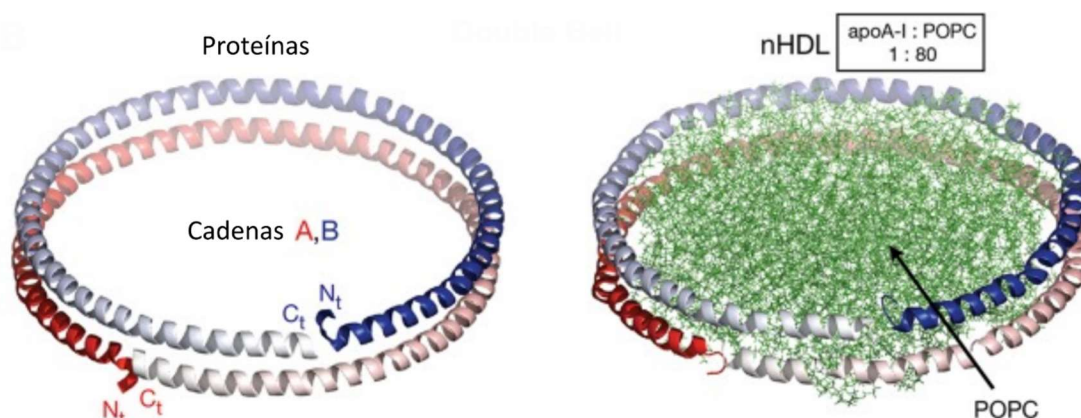


Figura 1.4. Modelos de estructuras de apoA-I en las partículas de HDL. La figura muestra a la izquierda el modelo de anillo del dímero de apoA-I ($\Delta 43$ -apoA-I) utilizado por Segrest y col. (1999) para construir el modelo de doble cinturón de nHDL. Las cadenas de apoA-I truncadas en el extremo N ($\Delta 43$ -apoA-I; coloreadas con gradiente rojo/azul) están orientadas en sentido antiparalelo y apiladas una encima de la otra en el registro de la hélice 5. A la derecha, se muestra el mismo modelo incluyendo en verde una bicapa lipídica formada a partir de 160 moléculas de POPC que son envueltos por la proteína; la superficie hidrofóbica interior del anillo de apoA-I interactúa con las cadenas de acilo del lípido.

ApoA-I juega un papel clave en la biogénesis, función y dinámica estructural de HDL. Dirige la evolución de las partículas de HDL para descargar y eliminar el exceso de colesterol a través del hígado, lo que evita su acumulación crónica en las arterias. De forma endógena, la apoA-I se secreta en forma de una proteína libre o pobre en lípidos (pre- β). Es sintetizada principalmente en el hígado y en menor medida en el intestino. La proteína libre también se forma mediante la remodelación de las partículas de HDL circulantes. En esta conformación acepta fosfolípidos y colesterol de los tejidos periféricos en un proceso mediado por el receptor ABCA1 dependiente de ATP. Las partículas HDL discoidales resultantes, originalmente de ~ 7 nm, aumentan de tamaño

debido a la captación de colesterol mediada por ABCA1 o ABCG1. Este colesterol es luego esterificado por la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) dando lugar a partículas esféricas más grandes con un núcleo lipídico rico en ésteres de colesterol. En última instancia, el colesterol se descarga de las partículas de HDL en los hepatocitos a través del receptor eliminador “scavenger” B-1 (SR-B1), o hacia las partículas de baja densidad (LDL) bajo la mediación de la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP). Por lo tanto, en el proceso general de TRC, el colesterol se moviliza y transporta desde los tejidos periféricos al hígado (Figura 1.5) (Leman et al 2014).

La vida media plasmática de apoA-I es de alrededor de cuatro días (Kontush y col. 2011), siendo los principales sitios de catabolismo y eliminación el hígado y el riñón. La apoA-I rica en lípidos se puede eliminar del plasma, junto con las partículas de HDL o LDL maduras, mediante receptores de holopartículas de HDL hepáticas o receptores de LDL, respectivamente, mientras que la apoA-I pobre en lípidos se puede eliminar mediante filtración glomerular en los riñones (Leman y col. 2014). Dada la complejidad del ciclo de vida de las HDL, el metabolismo de la apoA-I está influenciado por muchos receptores, proteínas de transferencia de lípidos y enzimas, por lo que su estabilidad y concentración plasmática se ven muy afectadas por las mutaciones del gen APOA1, así como por diversas proteínas asociado con la evolución de partículas HDL. Generalmente, cualquier mutación que evite la lipidación de las partículas de HDL reducirá los niveles plasmáticos de apoA-I, ya que los riñones la filtran fácilmente al ser una proteína relativamente pequeña.

No menos importantes en la prevención de la ECV son los roles asignados a la apoA-I y las HDL en los procesos requeridos para mantener el funcionalismo y la viabilidad endotelial. En este aspecto se sabe que, entre otras funciones la apoA-I, favorece la vasodilatación mediada por óxido nítrico (Drew y col. 2004), inhibe la secreción endotelial de moléculas de adhesión *in vivo* (Mu y col. 2015), e inhibe la apoptosis de células endoteliales (González-Pecchi y col. 2015). Estas actividades son vitales a fin de evitar complicaciones asociadas a patologías metabólicas como la diabetes, dislipemias y aterosclerosis.

Además de estar involucrada en las funciones mencionadas anteriormente, recientemente se ha descrito la participación de esta proteína en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune. A lo largo de su curso evolutivo, apoA-I/HDL contribuye a la parte humoral de la inmunidad innata (Catapano y col. 2014). Tiene actividad antiviral asociada con la prevención de la penetración viral, la facilitación de la muerte bacteriana mediada por el complemento, la protección contra el *Trypanosoma brucei* (un parásito protozoario), protege de la sepsis al unirse y neutralizar el

lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA), componentes de la pared celular de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente (Georgila et al 2019).

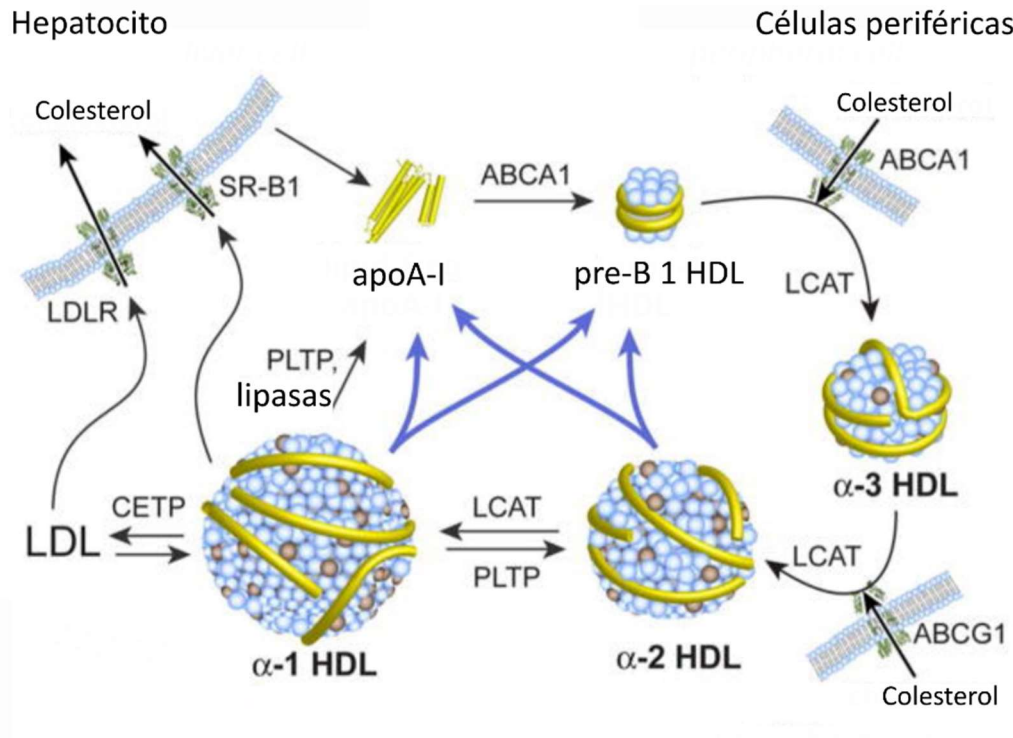


Figura 1.5. Esquema que representa especies y remodelación de HDL, flujo de colesterol y su transporte inverso. La apoA-I es secretada por el hígado y el intestino en forma de proteína sin o pobre en lípidos. La apoA-I pobre en lípidos también se forma por la fragmentación de partículas de HDL o LDL. Puede unirse a los fosfolípidos y al colesterol de las membranas celulares en un proceso mediado por ABCA1. Las partículas de pre-β HDL pequeñas y pobres en lípidos resultantes aumentan gradualmente de tamaño como resultado de la absorción y esterificación del colesterol, catalizadas por LCAT, lo que conduce a la formación de un núcleo lipídico rico en ésteres de colesterol. Las especies de HDL esféricas más grandes pueden aceptar fosfolípidos y colesterol libre de los tejidos periféricos a través de ABCG1. En última instancia, los ésteres de colesterol se descargan de las partículas de HDL a los hepatocitos a través del receptor SR-B1 o se transfieren a las LDL en un proceso mediado por CETP. Las acciones de PLTP y varias lipasas conducen a la remodelación de las HDL plasmáticas al promover la fusión o fragmentación de partículas. Abreviaturas: ABCA1/ABCG1, receptor dependiente de ATP1/G1; CETP, proteína de transferencia de éster de colesterol; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferasa; LDLR, receptor de lipoproteínas de baja densidad; PLTP, proteína de transferencia de fosfolípidos; SR-B1, receptor basurero B1 (Leman y col. 2013)

Muchos estudios que revelan la alteración en la expresión de apoA-I durante el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer sugieren que los niveles séricos de esta proteína pueden representar un biomarcador útil que contribuye a una mejor estimación del riesgo, el diagnóstico temprano, el seguimiento y la estratificación del pronóstico de estos pacientes (Georgila y col. 2019). Además, estudios recientes *in vitro* y en animales revelan un papel supresor de tumores más directo de apoA-I en la patogénesis de esta enfermedad, que involucra mecanismos antiinflamatorios e inmunomoduladores (Georgila y col. 2019).

1.2 ApoA-I y amiloidosis.

1.2.1 Definición de amiloide.

La Sociedad Internacional de Amiloidosis (ISA) utiliza el término amiloide para una proteína mal plegada que se acumula como fibrillas insolubles en varios sitios de órganos y tejidos para dar como resultado un síndrome clínico conocido como amiloidosis (Benson y col. 2018). La diversidad química en el amiloide y la amiloidosis ha sido evidente desde mediados de la década de 1970 y el número de proteínas amiloides humanas conocidas ha aumentado constantemente de dos en ese momento hasta 36 en la actualidad, pudiendo ser su origen hereditario (por mutaciones en la secuencia proteica) o adquirido (donde algún factor del microambiente celular aumenta la tendencia intrínseca de la proteína para agregarse). Dado lo tardío del diagnóstico, generalmente cuando hay síntomas clínicos, estas patologías con frecuencia son potencialmente mortales.

La estructura básica de todo amiloide es la fibrilla que está formada por protofilamentos retorcidos. Un protofilamento amiloide es una pila de capas de proteínas en una estructura de hoja β . Las fibrillas de amiloide se pueden formar a partir de 2, 3, 4 o muchos de estos protofilamentos, o en algunos casos de un solo protofilamento. Los protofilamentos están unidos entre sí de forma paralela a través de sus cadenas laterales (Benson y col. 2020).

Las manifestaciones clínicas de la amiloidosis son heterogéneas y pueden estar influenciadas por factores genéticos y ambientales. Aunque ciertos fenotipos pueden asociarse típicamente con ciertos tipos de amiloide, existe una superposición clínica considerable y, por lo tanto, no se recomienda la clasificación de las amiloidosis solo por motivos clínicos (Picken 2020). Según las directrices de la Sociedad Internacional de Amiloidosis (ISA), en medicina humana, el amiloide se reconoce microscópicamente por su estructura amorfa bajo microscopía óptica, con afinidad por el colorante rojo Congo y

su birrefringencia aumentada bajo luz polarizada después de dicha tinción. La calidad de la birrefringencia generalmente se describe como verde o incluso como “verde manzana” (Benson y col. 2020).

1.2.2 Agregación amiloide.

El plegamiento de un polipéptido recién sintetizado ocurre siguiendo una rápida secuencia de conformaciones en el citoplasma (Merlini y Bellotti 2003b). De acuerdo con la “Teoría del perfil energético del plegamiento de proteínas” este proceso se asemeja a un embudo en el cual las conformaciones intermedias devienen progresivamente en la formación de complejos más estables hasta formar la especie final. El plegamiento de proteínas es un proceso espontáneo que está guiado por interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno intramoleculares, fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas (Adamcik y Mezzenga 2018). Dado que, durante el proceso de plegamiento de proteínas una cadena polipeptídica desplegada necesita pasar por varios plegamientos intermedios para adquirir el estado de plegado nativo, el perfil energético hacia el estado nativo termodinámicamente favorable es a menudo accidentado. Esto significa que las moléculas necesitan cruzar barreras de energía cinética sustanciales. Sin embargo, puede ocurrir que el polipéptido adquiera un estado mal plegado alternativo y relativamente estable, el cual es propenso a la agregación (Merlini y Bellotti 2003b) (Onuchic et al 1997). Este proceso es esquematizado en la Figura 1.6.

Por qué las proteínas potencialmente amiloidogénicas se agregan, puede deberse a distintas razones y es motivo de un amplio campo de investigación. La mayoría de secuencias de proteínas contienen una o varias regiones cortas propensas a la agregación (APR) que pueden nuclear la agregación de proteínas. En condiciones normales, estas APR estarían protegidas de la agregación por interacciones de proteínas o porque están enterrados en el núcleo hidrófobo de los dominios de proteínas nativas. Sin embargo, la mutación, el estrés fisiológico o la desregulación de la homeostasis proteica relacionada con la edad aumentan la probabilidad de que las regiones de nucleación de agregación queden expuestas al disolvente. La agregación resultaría entonces del autoensamblaje de APR en aglomerados de estructura β que varían desde pequeños ensamblajes oligoméricos solubles hasta grandes inclusiones insolubles que contienen miles de moléculas (Beerten, Schymkowitz, y Rousseau 2012).

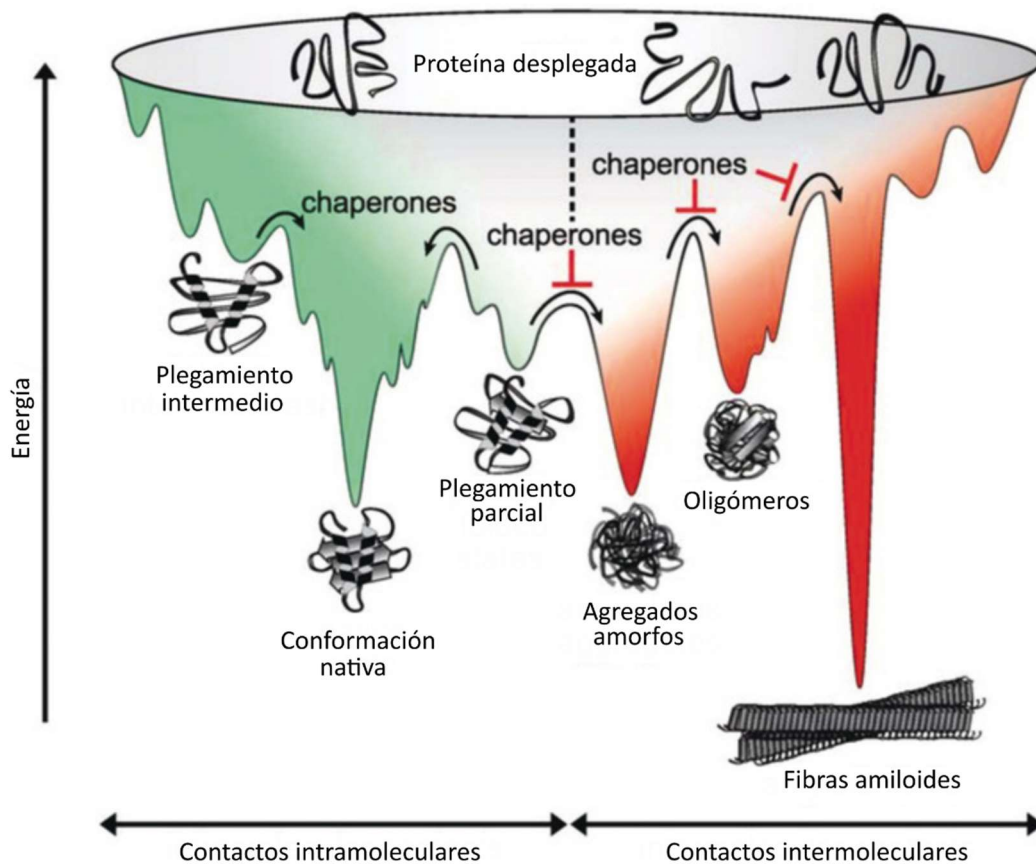


Figura 1.6. Perfil energético del plegamiento de proteínas (verde) y agregación (rojo). El plegamiento y la agregación de proteínas son reacciones en competencia. Las moléculas de polipéptido “muestran” varias conformaciones impulsadas por interacciones intramoleculares mientras viajan cuesta abajo en una superficie de energía libre potencial (parte verde) hacia el estado nativo termodinámicamente favorable. Los estados de plegamiento intermedio atrapados cinéticamente (intermedios de plegado y estados parcialmente plegados) ocupan estados de baja energía y son propensos a establecer interacciones intermoleculares (parte roja), lo que resulta en el ensamblaje de diversas formas de agregados, como agregados amorfos, oligómeros ricos en hojas β y fibrillas de amiloide, habiendo sido este último previamente postulado como el estado fundamental termodinámico. Las chaperonas moleculares brindan asistencia para el plegado al reducir las barreras de energía libre e inhibir las interacciones intermoleculares, lo que promueve el plegado en la conformación nativa (Adamcik y Mezzenga 2018).

Otro mecanismo propuesto para la agregación proteica es el reemplazo de un aminoácido que da lugar a una variante patológica, que induce en consecuencia amiloidosis hereditarias. En algunas de ellas la patogenicidad parece estar asociada a una disminución de la estabilidad estructural de la variante mutante, como es el caso de L55P para transtirretina (Quintas y col. 2001) y D67H para la lisozima (Canet y col. 1999). Un

tercer mecanismo propuesto es el remodelado proteolítico de una proteína precursora que genera fragmentos amiloidogénicos. Ejemplo de este último caso es el APP (proteína precursora de amiloide), una proteína del sistema nervioso central, la cual por acción de proteasas genera un péptido de 40-42 aminoácidos (Hardy y col. 2002). Este péptido, conocido como péptido-A β , es muy proclive a formar oligómeros y fibras amiloides insolubles, y es uno de los responsables de la enfermedad de Alzheimer (O'Brien y Wong 2011; Roychaudhuri y col. 2009).

La desestabilización es necesaria pero probablemente no suficiente para conferir una propensión amiloidogénica a una proteína ya que se requieren otras características estructurales para la formación de fibrillas. Además, todos los factores que perturban la estructura tridimensional, como un pH bajo, oxidación, aumento de temperatura, proteólisis limitada, iones metálicos y osmolitos, o la unión a glicosaminoglicanos de la matriz extracelular pueden cambiar el equilibrio hacia el estado amiloidogénico parcialmente plegado (Merlini y Bellotti 2003a).

El proceso típico de autoensamblaje de cadenas de polipéptidos en fibrillas de amiloide maduras se muestra en la Figura 1.7. La formación de fibrillas amiloides es el proceso de conversión de formas monoméricas solubles de proteínas o fragmentos de proteínas (péptidos formadores de amiloide o péptidos amiloidogénicos) en agregados insolubles que exhiben estructura fibrilar (Adamcik y col. 2018). El modelo más ampliamente aceptado de fibrilización amiloide es el modelo de polimerización dependiente de nucleación, donde el proceso de ensamblaje produce una curva cinética sigmoidea (medida por la fluorescencia de la tioflavina T o la dispersión de la luz). La cinética de la fibrilización amiloide sigue un proceso de tres pasos, que generalmente se caracteriza por una fase de latencia inicial larga, seguida de una fase de crecimiento exponencial rápido y completada por una fase de saturación (Adamcik y col. 2018).

Se ha descubierto que las fibrillas amiloides no solo se encuentran en la naturaleza como agentes patológicos, sino que también pueden tener actividades biológicas normales, lo que demuestra que la formación de fibrillas amiloides no está únicamente relacionada con la toxicidad y las enfermedades. Esta clase de fibrillas de amiloide, se hace referencia como fibrillas de amiloide funcionales, (Chapman y col. 2002; Fowler y col. 2007) por ejemplo, las que están asociadas con las propiedades adhesivas de los biofilms de *E. coli*, o estructuras fibrilares para el almacenamiento de hormonas peptídicas humanas.

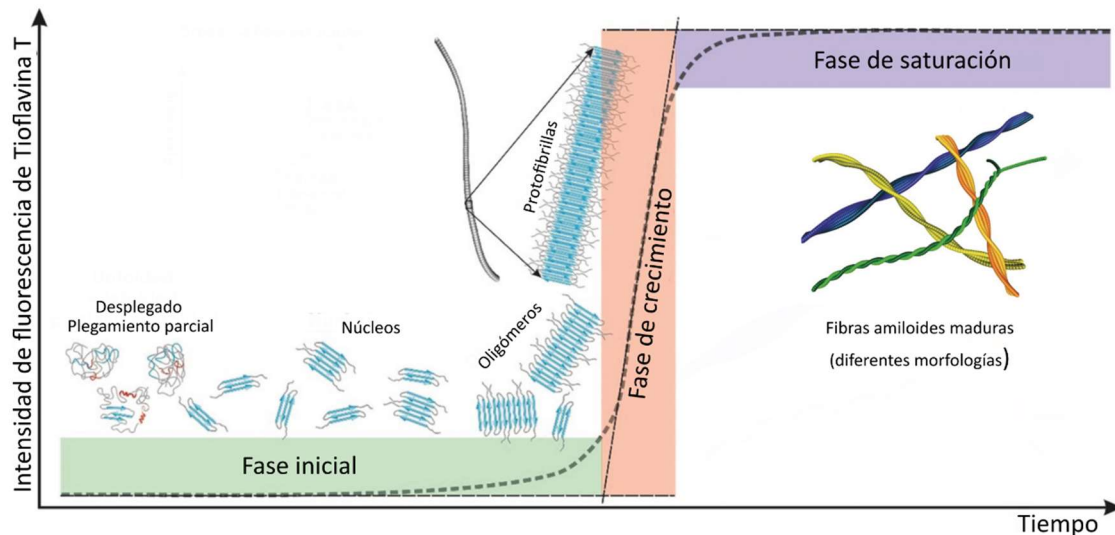


Figura 1.7. Autoensamblaje de cadenas peptídicas desplegadas o mal plegadas en fibrillas de amiloide maduras. El proceso de agregación ordenada (fibrilización amiloide) tiene una forma sigmoidea típica que contiene tres fases. La fase inicial corresponde al ensamblaje de las cadenas de péptidos en pequeños núcleos, que crecen por interacción intermolecular en oligómeros con estructuras de hoja β . En la fase de crecimiento, los núcleos y los oligómeros continúan interactuando, ensamblándose en estructuras prefibrilares que crecen rápidamente para formar estructuras fibrilares ordenadas conocidas como protofibrillas. La fase de saturación implica el ensamblaje de protofibrillas en fibrillas de amiloide multicatenarias maduras con diferentes estructuras morfológicas y un alto nivel de posible polimorfismo.

1.2.3 Amiloidosis.

Las amiloidosis son un grupo heterogéneo y poco común de trastornos que se caracterizan por el depósito de proteínas plegadas anormalmente en los tejidos. Los depósitos de amiloide se forman a partir de proteínas solubles, que sufren un plegado incorrecto y, posteriormente se agregan en fibrillas insolubles, lo que conduce a un daño orgánico progresivo (Picken 2020).

Podemos definir a la amiloidosis como la enfermedad causada por las fibrillas de amiloides maduras o durante el proceso de su formación. El término amiloidosis se utiliza para las diferentes enfermedades sistémicas potencialmente letales, pero también para un número limitado de depósitos localizados. Varias otras enfermedades que presentan características amiloides u otros agregados de proteínas (oligómeros citotóxicos, protofibrillas), actualmente no se denominan amiloidosis, aunque pueden llegar a serlo en el futuro. La enfermedad de Alzheimer (proteína amiloide: $A\beta$), la enfermedad de Parkinson (proteína amiloide: αSyn) y la diabetes tipo 2 (proteína amiloide AIAPP) pertenecen a estas enfermedades. Aunque existe una fuerte evidencia

de que los tres péptidos están involucrados en la patogénesis, estas enfermedades rara vez se denominan amiloidosis localizadas. Una razón es que para todos ellos hay investigadores que dudan del papel central de los componentes en el desarrollo de los trastornos. Además, los agregados oligoméricos en lugar de las fibrillas maduras pueden ser centrales en la patogénesis (Sipe y col. 2014).

En cuanto a la clasificación de esta patología, la más común refleja la localización del amiloide (sistémica frente a localizada) o el origen de la enfermedad (amiloidosis adquirida frente a hereditaria) (Gillmore y Hawkins 2013). En la amiloidosis sistémica, más de un órgano o sistema de órganos se ve afectado, mientras que en la amiloidosis localizada, solo un órgano o sistema de órganos está dañado. Los diferentes tipos de amiloidosis surgen de diferentes condiciones predisponentes: (1) la discrasia de células plasmáticas puede convertirse en amiloidosis de cadena ligera (AL) de inmunoglobulina; (2) la inflamación prolongada puede causar amiloidosis reactiva (AA); o (3) mutaciones germinales en ciertos genes pueden conducir a amiloidosis hereditaria (HA) (Sipe y col. 2010, 2016). Sin embargo, el origen de algunos otros tipos de amiloidosis causados, por ejemplo, por la proteína priónica PRNP o la proteína de membrana 2B ITM2B no se ha dilucidado, a pesar de la investigación en curso en esta área (Chyra Kufova y col. 2018).

Entre las amiloidosis hereditarias, la mayoría de los tipos son raras individualmente pero, en conjunto, constituyen aproximadamente el 10% de todas las amiloidosis sistémicas diagnosticadas actualmente. Sin embargo, esto puede representar un sub-diagnóstico (Picken 2020). La combinación de varios factores como un amplio espectro de órganos afectados, síntomas inespecíficos o su aparición rara (la incidencia combinada de todos los tipos de amiloidosis es de 10 por cada 1000000 habitantes), hace que la amiloidosis sea difícil de reconocer en poco tiempo para obtener el máximo resultado del tratamiento.

Las proteínas humanas capaces de formar fibras amiloides conocidas hasta ahora se muestran en la Tabla 1. Actualmente, se han identificado 36 proteínas como amiloidogénicas. Se han identificado 18 proteínas que aparecen como causantes de amiloidosis sistémica y 22 como formas localizadas. Debemos tener en cuenta que algunas proteínas pueden aparecer tanto como depósitos de amiloide sistémicos y como depósitos localizados a la vez. Muchos de los tipos de amiloide que se muestran en la Tabla 1 son raros o muy raros (Benson y col. 2020).

Hasta el día de hoy no es completamente conocida la razón por la cual los agregados proteicos son tóxicos. El simple mecanismo de reemplazo del tejido por depósitos amiloides parece insuficiente para explicar la toxicidad de estas proteínas. Es de nuestro particular interés el estudio de la amiloidosis asociada a apoA-I, que es el tipo

más común entre las amiloidosis producidas por apolipoproteínas (AI, AII, C-II, C-III) y es probablemente la segunda amiloidosis hereditaria sistémica más común (Benson 2012; Benson y col. 2020).

Tabla 1.1. Proteínas de fibras de amiloide y sus precursores en humanos.

Proteína fibrilar	Precursor	Sistémica/ Localizada	Adquirida/ Hereditaria	Órgano blanco
AL	Cadena liviana de Inmunoglobulina	S, L	A, H	Todos los órganos excepto SNC
AH	Cadena pesada de Inmunoglobulina	S, L	A	Todos los órganos excepto SNC
AA	(Apo) Amiloide sérico A	S	A	Todos los órganos excepto SNC
ATTR	Transtiretina, salvaje	S	A	Corazón principalmente en varones, pulmón, ligamentos
	Transtiretina, variantes	S	H	SNP, SNA, corazón, ojos, leptomeninges
A β 2M	β 2-microglobulina, salvaje	S	A	Músculo esquelético
	β 2-microglobulina, variantes	S	H	ANS
AApoAI	Apolipoproteína A I, variantes	S	H	Corazón, hígado, riñón, SNP, testículos, laringe, piel
AApoAII	Apolipoproteína A II, variantes	S	H	Riñón
AApoAIV	Apolipoproteína A IV, salvaje	S	A	Médula renal y sistémica
AApoCII	Apolipoproteína C II, variantes	S	H	Riñón
AApoCIII	Apolipoproteína C III, variantes	S	H	Riñón
AGel	Gelsolina, variantes	S	H	Riñón, cornea
ALys	Lisozima, variantes	S	H	Riñón

ALECT2	Factor quimiotático leucocitario-2	S	A	Riñón
AFib	Fibrinogeno α , variantes	S	H	Riñón
ACys	Cistatina C, variantes	S	H	SNC, SNP, piel
ABri	ABriPP, variantes	S	H	SNC
ADanb	ADanPP, variantes	L	H	SNC
A β	Proteína precursora A β protein, variante	LL	AH	SNC
A α Syn	α -Sinucleína	L	A	SNC
ATau	Tau	L	A	SNC
APrP	Proteína priónica, salvaje	LL	AH	Insomnio fatal
APrP	Proteína priónica, variantes	S	H	SNP
ACal	(Pro)calcitonina	LS	AA	Tumores tiroideos de células, Riñón
AIAPP	Polipéptido amiloide de los islotes	L	A	Islotes de Langerhans, insulinomas
AANF	Factor natriuretico atrial	L	A	Corazón
APro	Prolactina	L	A	Prolactinomas hipofisarios, hipófisis envejecido
AIns	Insulina	L	A	Iatrogénica, inyección local
ASPCd	Proteína tensioactiva pulmonar	L	A	Pulmón
ACor	Corneodesmosina	L	A	Epitelios cornificados, folículos pilosos
AMed	Lactaderina	L	A	Aórtica senil, media
AKer	Querato-epitelina	L	A	Cornea, hereditaria
ALac	Lactoferrina	L	A	Cornea
AOAAP	Proteína asociada a ameloblastos odontogénicos	L	A	Tumores odontogénicos
ASem1	Semenogelina 1	L	A	Vesícula seminal
AEnf	Enfurvitida	L	A	Iatrogénica
ACatKe	Catepsina K	L	A	Asociado a tumor

AEFEMP1e	Proteína 1 de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF (EFEMP1)	L	A	Venas porta, asociado al envejecimiento
----------	--	---	---	---

Abreviaturas: **S** Amiloidosis sistémica, **L** Amiloidosis localizadas, **A** Amiloidosis adquirida, **H** Amiloidosis hereditaria, **SNC** Sistema nervioso central, **SNP** Sistema nervioso periférico, **SNA** Sistema nervioso autónomo.

1.2.4 Mutaciones naturales en apoA-I

En la Tabla 1.2 mostramos algunas de las mutaciones conocidas en apoA-I, ya sea por su manifestación clínica o identificadas mediante estudios bioinformáticos. Las mismas inducen modificaciones estructurales en apoA-I libre de lípidos y/o pueden alterar el fenotipo de HDL *in vivo*. Aproximadamente la mitad de las mutaciones disminuyen los niveles plasmáticos de HDL y pueden agruparse en sustituciones de aminoácidos que inhiben la actividad de LCAT hasta cierto punto o están asociadas con amiloidosis (Sorci-Thomas y Thomas 2002). Las mutaciones que conducen a la inhibición de LCAT se encuentran principalmente dentro de las repeticiones 5, 6 y 7 de apoA-I, mientras que las responsables de la deposición de amiloide se encuentran principalmente en dos regiones: el extremo N de apoA-I y en un fragmento C terminal. La alteración de la función de las HDL por mutaciones sugiere que los cambios en la estructura terciaria de la apoA-I unida a lípidos afectan los niveles plasmáticos de HDL (Gogonea 2016).

Tabla 1.2. Recopilación de mutaciones de origen natural y bioingeniería en apoA-I humana.

Mutación	Efecto sobre la estructura y función de HDL
P3R	Interfiere con la formación de un giro β en N terminal
P3H	Interfiere con la formación de un giro β en N terminal
P4R	No tiene ningún efecto conocido sobre la RCT
R10L	No tiene ningún efecto conocido sobre el fenotipo HDL
D13Y	(apoA-I Yame) no tiene ningún efecto conocido sobre el fenotipo HDL

Q17P + FSX26	El cambio de marco (FS) y el codón de stop (X) reducen los niveles plasmáticos de HDL
G26R	Inicia la deposición de proteínas mutantes o fragmentos escindidos proteolíticos.
A37T	No crea deficiencia de apoA-I
W50R	Provoca amiloidosis hereditaria.
S52C	No tiene ningún efecto conocido sobre el fenotipo HDL.
L60R	Provoca amiloidosis autosómica dominante
Δ 60 -F71	Provoca amiloidosis sistémica y hepática hereditaria
Δ E70–W72	Provoca amiloidosis sistémica nefropática hereditaria
N74C	Reduce ligeramente la salida de colesterol.
D89E	No tiene ningún efecto conocido sobre RCT
L90P	Causa cardiopatía amiloide hereditaria
A95D	No afecta el fenotipo HDL
Y100H	No acelera la aterosclerosis.
D103N	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
Δ K107	Conduce a extensos depósitos de amiloide en la íntima e inhibe la activación de LCAT
K107C	Aumenta la salida de colesterol
K107M	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
W108R	No afecta el fenotipo HDL
E110K	No afecta el fenotipo HDL, reduce la actividad LCAT
G129C	Aumenta la estabilidad estructural, reduce la capacidad de unión de lípidos, reduce ligeramente la salida de colesterol
E136K	Efecto sobre el fenotipo HDL no se conoce
E136X	Produce deficiencia de HDL circulante

E139G	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
Δ R140 – D150	Afecta la estructura α -helicoidal, reduce la activación de LCAT
R140 –D150 Q63 –D73	No afecta la estructura α -helicoidal, reduce la activación de LCAT
L141R	Influye en la salida de colesterol al plasma e interfiere con la formación de HDL
P143R	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
P143A	Afecta la estructura α -helicoidal, reduce la activación de LCAT
L144R	Disminuye los niveles de HDL en plasma, HDL tiene más TG y menos CE
L144P	Disminuye los niveles de HDL en plasma, no tiene efecto sobre las ECV
Δ E146-R160	Conduce a apoA-I y colesterol HDL en plasma por debajo del 15% de los niveles normales
E147V	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
R149A	Reduce la actividad de LCAT
R149V	No afecta la estructura α -helicoidal, reduce la actividad de LCAT
R151C	Inhibe la activación de LCAT, reduce los niveles de HDL
R153P	Reduce los niveles de HDL y se asocia con CAD
V156E	Disminuye los niveles de HDL en plasma e inhibe la activación de LCAT
A158E	Se asocia con niveles bajos de HDL en plasma
L159R	Se asocia con niveles bajos de HDL en plasma
L159P	Se asocia con niveles bajos de HDL en plasma y CAD prematura
R160L	Se asocia con niveles bajos de HDL en plasma e inhibición de LCAT
H162Q	No produce aterosclerosis acelerada, reduce la actividad de LCAT
H162-A207; Δ K208- Q243	Conduce a niveles bajos de apoA-I y HDL y xantomas bilaterales del tendón de Aquiles, el codo, la articulación de la rodilla y opacidades corneales

P165R	Se asocia con niveles más bajos de apoA-I y HDL
Δ P165-A175	Altera la activación de LCAT e induce una hipoalfalipoproteinemia familiar dominante
Y166F	Afecta la actividad LCAT
E169Q	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
R173P	Se asocia con amiloidosis cardíaca y cutánea.
R173C	Se asocia con niveles plasmáticos reducidos de HDL y niveles elevados de TG
R177H	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
L178H	Conduce a una conformación alterada, estabilidad disminuida, capacidad de unión de lípidos reducida, forma fibrillas
L 178 P	Disminuye los niveles de HDL, conduce a disfunción endotelial, aumento del grosor de la pared arterial, CAD
Δ E191-P220	Se asocia con una unión de lípidos defectuosa y niveles más bajos de HDL.
K195C	Reduce la capacidad de unión de lípidos y afecta la salida de colesterol.
E198K	Se desconoce el efecto sobre el fenotipo HDL.
L203-F229; Δ L230-Q243	Causa deficiencia de HDL, inhibición parcial de LCAT y opacidad corneal
D213G	El efecto sobre el fenotipo HDL no se conoce
L218A	Se asocia con disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y apoA-I.
L219A	Se asocia con disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y apoA-I.
V221A	Se asocia con disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y apoA-I.
L222A	Se asocia con disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y apoA-I.
E223A	Se asocia a alteraciones del fenotipo HDL.
E223-Q243	Conduce a una pérdida crítica de la unión de lípidos y niveles bajos de HDL
F225A	Se asocia con una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol, HDL y apoA-I.

K226A	Se asocia a alteraciones del fenotipo HDL.
V227A	Disminuye los niveles plasmáticos de colesterol, HDL y apoA-I
F229A	Disminuye los niveles plasmáticos de colesterol, HDL y apoA-I
L230A	Disminuye los niveles plasmáticos de colesterol, HDL y apoA-I
ΔE235	Se asocia con una disminución de la estabilidad de las proteínas y niveles bajos de HDL en plasma

1.2.4.1 Variantes naturales de apoA-I que afectan el metabolismo de las HDL.

Las sustituciones de aminoácidos que ocurren naturalmente en la apoA-I humana asociadas con niveles bajos de HDL y eficiencia catalítica disminuida de LCAT se han revisado extensamente (Kunnen y Van Eck 2012; Schaefer, Anthanont, y Asztalos 2014; Sorci-Thomas y Thomas 2002). Numerosos estudios de mutación/delección identificaron los dominios apoA-I que son críticos para la interacción LCAT con HDL. Una gran cantidad de evidencia experimental sugiere que las modificaciones estructurales dentro de las repeticiones 5, 6 y 7 de apoA-I (P121- G186) alteran su conformación evitando que LCAT se una a HDL o reduciendo su eficiencia catalítica para convertir el colesterol libre en esterificado, lo que lleva a una disminución en los niveles plasmáticos de HDL maduro y una interrupción en el ciclo de RCT (Gogonea 2016a).

Llamativamente, apoA-I Milano, que tiene una arginina sustituida con una cisteína (R173C) dentro de la repetición 7, permite que los dímeros de apoA-I se unan covalentemente a través de enlaces disulfuro. La gran proporción de partículas de HDL que tienen cadenas de apoA-I bloqueadas a través de un enlace disulfuro contribuye al tamaño restringido de HDL, niveles plasmáticos más bajos de HDL y actividad de LCAT alterada (Calabresi y col. 1994; Gogonea 2016). Estos efectos sobre el fenotipo HDL deberían aumentar el riesgo de aterosclerosis pero las lesiones ateroscleróticas en pacientes con ECV retrocedieron cuando se administró apoA-I Milano por vía intravenosa (Nissen y col. 2003). De manera similar a apoA-I Milano, apoA-I Paris (R151C, en la repetición 5, P143-A164) forma homodímeros que restringen la movilidad de la apoA-I y probablemente alteran su conformación, sin embargo, este mutante no parece alterar el fenotipo HDL (Daum y col. 1999).

1.2.4.2 Variantes naturales de apoA-I asociadas con amiloidosis hereditaria.

De todas las variantes naturales conocidas de apoA-I, 19 fueron descritas induciendo amiloidosis de distinta severidad. La mayoría de las mutantes reportadas

como amiloidogénicas implican la sustitución de un aminoácido, aunque también se han reportado mutantes con delección de uno o más residuos. Muchas de las sustituciones se dan con ganancia de un aminoácido polar con carga positiva, generalmente arginina, lo que sugiere que la presencia de una carga extra podría resultar en un rol patogénico (Obici y col. 2006). No obstante, hay variantes que no se dan con ganancia de una carga positiva, pero sí con la pérdida de un residuo hidrofóbico. Otro patrón frecuente es que muchas variantes ganan un residuo de prolina el cual cabe considerar por su carácter disruptor de estructuras α -hélice. Es interesante resaltar, que a pesar de las numerosas variantes de apoA-I detectadas induciendo amiloidosis, todas son descritas en países desarrollados, por lo que es de suponer y esperar que con la implementación futura de estudios genéticos se identifiquen nuevas mutaciones patológicas de esta proteína en nuestro medio.

Un componente frecuente en las lesiones amiloides donde se encuentra involucrada apoA-I, es un péptido que corresponde al fragmento N-terminal de la proteína de aproximadamente 9-11 kDa (Adachi y col. 2012). La composición de apoA-I en las fibrillas se ha estudiado con anticuerpos específicos hacia el extremo N y el análisis de la secuencia de aminoácidos. Ambas técnicas indican que la región N terminal del polipéptido es el constituyente principal de las fibrillas. Debido a la escasez de material recuperable de la placa, la descripción detallada del tamaño del polipéptido depositado es escasa. Una de las caracterizaciones químicas de este tipo de fibrillas que se logró fue en un caso en el que la proteína constitutiva amiloide fue el segmento N-terminal de apoA-I 1-69 y correspondía a un paciente heterocigoto para la delección de K107 (Obici y col. 2006). Generalmente en las lesiones cardíacas este péptido abarca hasta el residuo 93 (apoA-I 1-93), mientras que en otros órganos se encuentran fragmentos 1-80 hasta 1-100 (Adachi y col. 2012). La presencia de estos fragmentos se debería principalmente a la actividad de diversas proteasas que se encuentran particularmente activas en las zonas de la lesión, posiblemente como respuesta a un estímulo inflamatorio. Ocurre, también, que la proteína libre es más susceptible a la proteólisis que cuando esta acompañada con lípidos (Mucchiano y col. 2001; Obici y col. 2006). Sin embargo, no está claro aún si la proteólisis precede al depósito proteico, o si la conformación fibrilar ocurre en la secuencia completa de la proteína exponiendo luego sitios de clivaje.

En base al hallazgo del péptido N-terminal en las lesiones, sería esperable que esta región de la proteína presentara la mutación pro-amiloidogénica, pero no es así necesariamente. Si bien gran parte de las mutaciones descritas se encuentran entre los aminoácidos 50 y 93, Erickson y colaboradores identifican como “hot spot” otra región comprendida en la región 170-178 por la alta frecuencia de variantes involucrando esa zona (Eriksson y col. 2009). Incluso otras sustituciones son descritas fuera de estas

regiones. Muchas mutaciones de apoA-I están asociadas con depósitos de fibras amiloides predominantemente en hígado, riñones y corazón, y en menor frecuencia en piel, testículos, laringe y nervios periféricos. Con cierta asiduidad se observa, postmortem, un extenso depósito visceral de material amiloide, y en muchos casos con evidente insuficiencia renal (Matsunaga y col. 2010a). Si bien la penetrancia de las mutaciones de apoA-I asociadas a amiloidosis es alta, los depósitos se desarrollan durante décadas antes de que los síntomas se hagan evidentes.

La variante apoA-I K107del es de particular interés en nuestro caso y fue seleccionada para ser estudiada en el desarrollo de esta tesis. Esta proteína, que involucra una pérdida de carga positiva (una delección del residuo de lisina en posición 107), es propensa formar estructuras amiloides con la característica de haber sido asociada a depósitos de fibras en la íntima de vasos sanguíneos, la cual está estrechamente relacionada con la generación de arterosclerosis severa (Mucchiano y col. 2001). Además de las mutaciones mencionadas, apoA-I con su secuencia nativa también está involucrada en amiloidosis del tipo no hereditaria. Se ha reportado (por inmunohistoquímica y tinciones con rojo congo) la presencia de depósitos amiloides de la proteína salvaje asociadas a placas ateroscleróticas seniles (Westermarck y col. 1995). Este hallazgo sugiere la posibilidad de que los microambientes relacionados con las lesiones ateroscleróticas puedan afectar su conformación e inducir su agregación.

1.2.5 Efectos de las modificaciones postraduccionales en la funcionalidad de apoA-I

Las modificaciones postraduccionales (PTM) de apoA-I (cloración, oxidación, nitración, carbamilación, etc.) hacen que la HDL sea disfuncional, y existe un gran y creciente cuerpo de estudios clínicos y funcionales que sugieren que la HDL disfuncional está directamente asociada con la aterosclerosis y la progresión de la ECV (Fisher y col. 2012). Por ejemplo, Shao y col. demostraron que la modificación de las lisinas de apoA-I por aldehídos (acroleína y malondialdehído) inhibe la remoción de colesterol mediada por ABCA1 (Shao y col. 2005). Por otro lado, varios laboratorios de investigación identificaron a la mieloperoxidasa (MPO) como un factor enzimático importante que modifica químicamente la apoA-I en varias formas oxidadas (por ejemplo, cloro, bromo, oxi, nitro, nitrilo, carbamil, etc.) que son abundantes en lesiones ateroscleróticas y detectables en el plasma de pacientes con ECV. Todas estas PTM, sumadas a otras como la oxidación de los residuos triptófano, son casos que deterioran la función de apoA-I en la remoción de colesterol mediada por ABCA1 y reducen la actividad de LCAT (Gogonea 2016a).

Otra PTM de apoA-I, detectada en muestras de plasma de pacientes con diabetes tipo 1, que reduce la eficiencia catalítica de LCAT y altera el transporte de colesterol, es la oxidación de metionina (Brock y col. 2008). Es interesante observar que los residuos de metionina oxidada alteran la conformación del extremo N y C cuando la apoA-I está libre o unida a lípidos, y los experimentos de proteólisis parcial sugieren que, después de la oxidación de la metionina, la región N terminal se vuelve altamente accesible a los disolventes y en la apoA-I unida a lípidos se proteoliza en Y192 (Gogonea 2016b). En suma, se ha detectado la apoA-I en la placa aterosclerótica nitrada en la tirosina 166 y con una capacidad alterada para activar LCAT. Di Donato y col. demostraron que el mutante TyrNO₂166-apoA-I reduce la capacidad de la apoA-I unida a lípidos para activar LCAT *in vitro*, sin embargo, el impacto en el fenotipo HDL *in vivo* aún no se comprende (DiDonato y col. 2014). Además de las anteriores, se ha descrito a la reticulación o entrecruzamiento químico como otra probable PTM. DiDonato demostró, a través de la cuantificación de apoA-I en lesiones ateroscleróticas, que aproximadamente dos tercios (66 ± 4%) de apoA-I dentro de las lesiones estaba entrecruzada oxidativamente.

En conclusión, las PTM de apoA-I resultantes de la interacción de las HDL con varios agentes biológicos (ya sean metabolitos o enzimas) disminuyen la capacidad de la apoA-I para intercambiar entre estados libres de lípidos/pobres en lípidos y unidos a lípidos (en el metabolismo de las HDL), una característica fundamental indispensable por su participación en el ciclo del transporte reverso de colesterol (Gogonea 2016b; DiDonato y col. 2013). Es de nuestro particular interés en este trabajo de tesis ahondar en el estudio del efecto de las modificaciones postraduccionales de un entorno inflamatorio sobre apoA-I y respondernos si este mecanismo haría más propensas a la agregación a los mutantes reportados como amiloidogénicos.

1.3 Inflamación, aterosclerosis y apoA-I.

La inflamación se considera el factor determinante de muchas enfermedades, como la aterosclerosis, el cáncer, la autoinmunidad y las infecciones, y es un factor importante que contribuye a las afecciones relacionadas con la edad. Funcionalmente, la inflamación se define como una respuesta protectora del organismo a la estimulación por patógenos invasores o señales endógenas como las células dañadas, lo que resulta en la eliminación de la causa inicial de la lesión, el aclaramiento de las células necróticas y la reparación del tejido. Sin embargo, debido a los procesos moleculares, inmunológicos y fisiológicos complejos, a menudo simultáneos, implicados en la respuesta inflamatoria, definir claramente la inflamación presenta un desafío (Netea y col. 2017).

1.3.1 Elementos básicos de la inflamación.

La inflamación se induce cuando las células huésped detectan estructuras conservadas evolutivamente en patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos) o señales de estrés endógeno (patrones moleculares asociados a peligros) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) codificados en la línea germinal (Akira y col. 2006). Los PRR se expresan principalmente por células mieloides, como monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, pero también son expresados por linfocitos, fibroblastos y células epiteliales (Iwasaki y Medzhitov 2004). La estimulación celular desencadena procesos inflamatorios mediante la liberación de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. Las citoquinas TNF e IL-1 β tienen efectos autócrinos y parácrinos que conducen a la activación local de macrófagos y neutrófilos, pero cuando estas citoquinas se liberan en grandes cantidades, pueden ejercer efectos endócrinos, como la inducción de proteínas reactantes de fase aguda en el hígado, activación plaquetaria, fiebre, fatiga y anorexia. Además, activan las células endoteliales, lo que conduce a un aumento del flujo sanguíneo, reclutamiento de neutrófilos y macrófagos mediado por la expresión de agentes quimioatrayentes y proteínas de adhesión como lo son selectinas, integrinas, molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1). Se incrementa la permeabilidad del endotelio lo que genera la migración de las células del sistema inmune hacia los tejidos extravasculares (Pober y Sessa 2007).

La función principal de las citoquinas es reclutar células inmunes adicionales al sitio de infección; estas células incluyen neutrófilos, que ejercen un papel crucial en la fagocitosis y la destrucción de patógenos (Netea y col. 2017). En este contexto los neutrófilos, o polimorfonucleares (PMN), juegan un rol fundamental puesto que responden rápidamente a la presencia de antígenos o señales inflamatorias. Cuando estas células son activadas sintetizan IL-1, IL-6, IL-12, TGF- β (factor de crecimiento transformante β) y TNF- α , las que actúan activando otros neutrófilos y otras células del sistema inmune. Durante la activación, estas células experimentan un estallido oxidativo que genera la producción de ROS (O_2^- , HO^\cdot , H_2O_2) por acción de la NADH oxidasa, y HClO por la vía de la mieloperoxidasa. La activación también promueve la liberación de gránulos que portan una gran variedad de proteasas (elastasa, colagenasa, gelatinasa) que resultan en una elevada actividad proteolítica tanto para el antígeno como para el entorno (Wright y col. 2010). Además de la fagocitosis clásica, los PMN pueden liberar cromatina, histonas, proteínas antimicrobianas y serina proteasas extracelularmente para formar trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que conforman fibras de ADN en forma de red (Fuchs y col. 2007). Las NET pueden atrapar patógenos para limitar su

dispersión, desencadenar la coagulación e inducir daño endotelial. Desde la primera caracterización de las NET en 2004, los estudios de sus efectos se han ampliado para revelar roles inesperados en la inflamación estéril inducida por PMN (Sørensen y Borregaard 2016).

Cuando el proceso inflamatorio ya está en marcha, las células endoteliales reclutan macrófagos, en forma de monocitos, que migran hacia el tejido extravascular donde, por acción del INF- γ (interferón gama), se diferencian y adquieren su fenotipo de macrófago y contribuyen con el proceso inflamatorio sintetizando citoquinas y agentes quimioatrayentes, factores de crecimiento y liberando proteasas (Shi y Pamer 2011).

En el torrente sanguíneo, los monocitos y neutrófilos activados liberan citoquinas, que a su vez estimulan la liberación de prostaglandinas, moléculas que median los signos y síntomas de la enfermedad (somnolencia, fatiga y fiebre) al actuar sobre el hipotálamo. Un aspecto importante de los mediadores de la inflamación en la circulación es la activación del sistema del complemento, que induce la opsonización y muerte microbiana, y genera péptidos inflamatorios como C3a y C5a (Netea y col. 2017).

Los mecanismos que apagan la respuesta inflamatoria tienen una importancia primordial en el retorno a la homeostasis. La resolución no es simplemente la eliminación del agente estresante, sino que es un proceso activo que implica la reprogramación funcional de las células a través de la producción de mediadores. El proceso finaliza cuando se remueve el estímulo y se recompone la arquitectura tisular. Si el estímulo no es eliminado el proceso inflamatorio persiste y evoluciona, inclusive puede convertirse en un escenario crónico.

1.3.2 Aterosclerosis

La aterosclerosis es un proceso que da lugar al estrechamiento o la oclusión completa de la luz arterial y está altamente relacionada al proceso inflamatorio. Es la enfermedad arterial más importante y conocida que tiene un curso de por vida e inicialmente asintomático. En su etapa final da lugar a infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares y enfermedad vascular periférica (Poston 2019). El fenómeno previo a la aterosclerosis es el daño del endotelio, ya que desencadena el reclutamiento de células inflamatorias y de lípidos (en especial colesterol), un proceso complejo y donde ambos factores se retroalimentan. Las LDL son las lipoproteínas involucradas en el aporte de colesterol hacia células de tejidos periféricos, siendo internalizadas al ser reconocida la apoB100 por los receptores específicos de membrana. El contenido de colesterol celular está altamente regulado para evitar su acumulación. Así un exceso de colesterol celular inhibe entre otros pasos su propia síntesis de *novo* y la captación desde las LDL circulantes. Mientras las LDL circulan en plasma están protegidas de la

oxidación por numerosos antioxidantes incluyendo enzimas y vitaminas. Sin embargo, ante el daño endotelial estas lipoproteínas pueden llegar a la íntima donde dicha protección desaparece. En este caso la apoB100 oxidada es reconocida por los receptores basureros que no están regulados. Como resultado los macrófagos (reclutados ante la lesión hacia el espacio subendotelial) se sobrecargan de lípidos almacenándolos en vesículas endocíticas y dando lugar a las denominadas células espumosas. Ante la muerte de estas células se liberan los lípidos, que forman depósitos dentro de la íntima. Estos depósitos se transforman en los centros de la placa aterosclerótica madura. La deposición excesiva de colesterol en el espacio subintimal puede provocar la precipitación de cristales de colesterol, que desencadenan el inflammasoma NLRP3 y, en consecuencia, la liberación de IL-1 β activa. Las células que median la respuesta inmune adaptativa, incluidas las células T y B, también ingresan a la pared arterial durante la aterogénesis, donde regulan las funciones patogénicas de las células inmunes innatas en la placa. Las células musculares que migran dentro de la íntima sintetizan matriz rica en colágeno que cubre los acúmulos de lípidos formando un “capuchón fibroso”. Este capuchón contiene además macrófagos activos, que a medida que la lesión avanza segregan metaloproteasas (MMP) degradantes de la matriz y que puede resultar en el desprendimiento de la placa (Poston 2019). Un esquema resumido del inicio y la progresión de la aterosclerosis se muestra en la Figura 1.8.

Se ha subestimado la contribución de los neutrófilos a la enfermedad cardiovascular. Estudios recientes han indicado que los PMN se adhieren a las placas ateroscleróticas, principalmente a través de la formación de NET (Fuchs y col. 2007). Los datos actuales indican que las NET no solo están presentes en placas y trombos, sino que también tienen un papel causal en el desencadenamiento de la formación de estas placas ateroscleróticas y trombos venosos (Qi, Yang, y Zhang 2017).

Como se resume de lo anterior, la inflamación desempeña un rol fundamental en la aterogénesis. Normalmente esta respuesta se inicia por un antígeno o por un traumatismo. Curiosamente hasta la fecha no se ha identificado ningún antígeno específico capaz de iniciar este proceso. Podría existir una similitud molecular entre estos posibles antígenos y los patógenos exógenos. Los posibles antígenos podrían ser agentes infecciosos o moléculas modificadas generadas por ROS (Baynes y Dominiczak 2005).

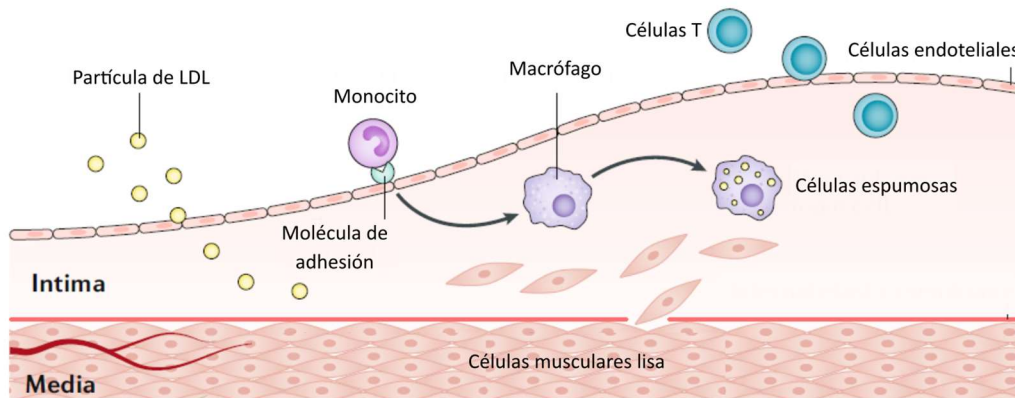


Figura 1.8. Inicio y progresión de la aterosclerosis. En la etapa temprana del inicio de la lesión, las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se acumulan en la íntima y pueden sufrir modificaciones oxidativas y de otro tipo que pueden volverlas proinflamatorias e inmunogénicas. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo y pueden unirse a moléculas de adhesión expresadas por células endoteliales activadas. Las citoquinas pueden promover la migración de los monocitos unidos hacia la pared arterial. Una vez en la íntima, los monocitos pueden madurar en macrófagos. Estas células expresan receptores que les permiten unirse a partículas de lipoproteínas y convertirse en células espumosas. Los linfocitos T, aunque numéricamente menos abundantes que los monocitos, también entran en la íntima y regulan las funciones de las células inmunitarias innatas, así como de las células endoteliales y del músculo liso. Células de músculo liso en la túnica media pueden migrar hacia la íntima en respuesta a los mediadores elaborados por los leucocitos acumulados. Modificado de Libby y col. 2019.

1.3.3 ApoA-I y su rol dual

Uno de los primeros eventos en el desarrollo de una lesión aterosclerótica son los cambios proinflamatorios en las células endoteliales que se manifiestan como un aumento de la expresión de la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1). Las HDL, pero no la apoA-I sin lípidos o pobres en lípidos, reducen la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en cultivos de células endoteliales inflamadas (Baker et al. 1999; Calabresi et al. 1997).

Las HDL asumen un rol como agente anti-aterogénico. Extensiva investigación estadística reporta que la concentración de HDL es inversamente proporcional al riesgo aterosclerótico. Como fue mencionado más arriba, esto no sólo se debe a su habilidad para promover la remoción de colesterol desde las células, sino también a sus funciones como anti-oxidantes, anti-inflamatorias y anti-trombóticas que no son menos importantes. El rol anti-inflamatorio de las HDL involucra limitar la peroxidación de

lípidos, influenciar la expresión de citoquinas, modular el reclutamiento y adhesión de monocitos, y modificar otros aspectos de la función endotelial (Ansell y col. 2005). La base mecanicista de estos hallazgos está relacionada con la inhibición del factor nuclear, NF- κ B (un regulador maestro de la inflamación), aumento de la expresión de la 3 β -hidroxiesteroide- Δ 24 reductasa (la enzima que convierte el desmosterol en colesterol en el paso final de la ruta de biosíntesis del colesterol), y activación de la enzima citoprotectora, hemo oxigenasa-1. Más recientemente, se ha descubierto que apoA-I inhibe la inflamación en las células endoteliales indirectamente al aumentar la expresión de la anexina A1 e inhibir la activación de la fosfolipasa A2 (Cochran y col. 2021).

Ha sido demostrado que las LDL oxidadas inducen daño endotelial. La apoB100 (proteína mayoritaria de las LDL) oxidada se une a la matriz extracelular aumentando la retención de las mismas en la pared vascular. Los fosfolípidos oxidados contenidos en esta lipoproteína serían los principales inductores de inflamación. Las HDL contrarrestan este proceso, supuestamente previniendo la transferencia de lisofosfolípidos desde las LDL oxidadas a las células endoteliales (O'Connell y Genest 2001). Paradójicamente las HDL también pueden ser partículas pro-inflamatorias y pro-aterogénicas (Cochran y col. 2021). La evidencia muestra que muchos procesos asociados con respuesta inflamatoria como pueden ser infecciones, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares, se caracterizan por presentar HDL disfuncionales y pro-inflamatorias.

Cochran y col. en una revisión actual describen que apoA-I libre de lípidos inhibe la activación de macrófagos, el tipo de célula proinflamatoria predominante en las lesiones ateroscleróticas, por tres vías principales: (i) interactuando con ABCA1 en un proceso que activa la Janus quinasa 2/transductor de señal activador de la transcripción 3 (JAK/STAT) y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias; (ii) remueve el exceso de colesterol de las células de una manera dependiente de ABCA1; e (iii) inhibe la degradación de ABCA1 en un proceso facilitado por una proteína de unión a apoA-I que transloca el receptor tipo Toll (TLR) 4 fuera de los dominios "lipid rafts" o balsas lipídicas. Esto reduce la disponibilidad de TLR4 para la activación por sus ligandos, como el lipopolisacárido (LPS), y disminuye la activación de los efectores descendentes de TLR4: la proteína adaptadora de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) Jun N-quinasa terminales (JNK1/2), quinasa 1/2 regulada por señal extracelular (ERK1/2) y p38MAPK y NF- κ B. Las preparaciones de HDL y rHDL (reconstituidas sintéticas) también reducen la inflamación en los macrófagos en un proceso que depende de la activación del factor de transcripción Atf3. Se desconoce si la capacidad de Atf3 para inhibir la inflamación en

los macrófagos es impulsada por apoA-I o por otros constituyentes de HDL, como los fosfolípidos bioactivos (Cochran y col. 2021).

Las HDL plasmáticas y las rHDL también causan inflamación y aumentan la secreción de citoquinas proinflamatorias en los macrófagos que están excesivamente reducidos de colesterol (Fotakis y col. 2019). Este es un mecanismo potencialmente importante para reducir los efectos perjudiciales de las infecciones bacterianas, pero claramente no es favorable para la aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias. Los mecanismos precisos de los efectos proinflamatorios de apoA-I y HDL en macrófagos con deficiencia de colesterol no están bien definidos.

El concepto de HDL disfuncional no es nuevo. La edad en sí misma puede ser un determinante crítico de la función de las HDL. En estados patológicos, como la diabetes y el síndrome metabólico, la enfermedad renal crónica, la inflamación crónica y la aterosclerosis, muchas de las funciones de las HDL se deterioran. ApoA-I, al ser la proteína principal dentro de HDL, es un objetivo de varias modificaciones oxidativas, especialmente por MPO dentro de la placa aterosclerótica. ApoA-I, como mencionamos, puede sufrir cloraciones en el residuo tirosina (Tyr), sulfoxidación en metioninas (Met) y oxidación en triptófano (Trp); estas modificaciones están asociadas con una alteración de la biogénesis de HDL y una disminución del flujo de salida de colesterol celular. El proteoma de HDL también se altera notablemente en la aterosclerosis y está enriquecido en proteínas inflamatorias como apoCIII y amiloide A sérico (SAA). La HDL enriquecida con SAA altera la salida de colesterol celular y las propiedades antiinflamatorias del HDL (Schwertani y col. 2018). La apoA-I y las partículas de HDL quedan retenidas en la pared arterial sometidas a este microambiente perjudicial. En una serie de experimentos, DiDonato y col. demostraron que la apoA-I libre de lípidos y las HDL abundan en las placas ateroscleróticas en concentraciones más de 100 veces superiores a las que se encuentran en las aortas normales. Además, la mayoría de la apoA-I aislada es pobre en lípidos o libre de lípidos y esta apoA-I exhibió una marcada disminución en la salida de colesterol celular, con un alto grado de oxidación y entrecruzada (DiDonato y col. 2013; Huang y col. 2014; Rosenson y col. 2016).

Por todo lo mencionado, consideramos que distintos procesos celulares, en particular los asociados a inflamación, pueden interactuar definiendo la relación estructura-función-citotoxicidad de una proteína. A pesar de la identificación de la patología en pacientes, muy poco se sabe respecto a los procesos microambientales que puedan alterar este delicado equilibrio entre una estructura fisiológica y otra no funcional o incluso citotóxica. Cabe mencionar además que si bien la mayor parte de la apoA-I circula unida a lípidos formando parte de las HDL, estudios previos indican que la proteína libre, generada por catabolismo de estas lipoproteínas es más inestable y

susceptible de modificaciones estructurales (Safi, Maiorano, y Davidson 2001). El aumento de concentración de proteína libre en lesiones ateroscleróticas avalan este hecho (Curtiss y col. 2006).

1.4. Hipótesis de trabajo

En base a todo lo expuesto y el hallazgo de variantes de apoA-I en forma de agregados de tipo amiloide en varios órganos y con distinta severidad, planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

- 1) los parámetros estructurales de las variantes proteicas naturales pueden determinar su tendencia a la agregación.
- 2) la presencia de un microambiente pro-inflamatorio crónico favorece un procesamiento anómalo de la proteína, la que se vuelve patológica y sufre pérdida de sus funciones biológicas.
- 3) la apoA-I con mutaciones en su secuencia nativa posee conformaciones anómalas que inducen daño celular y es por sí misma pro-amiloidogénica y citotóxica.
- 4) una posibilidad combinada de los puntos anteriores, en la que agregados anómalos de la proteína puedan inducir activación de respuesta pro-inflamatoria que perpetúa el cuadro existente.

Capítulo 2:

Restricciones evolutivas y estructurales que influyen en el comportamiento amiloide de la apolipoproteína A-I

Este capítulo ha sido adaptado de:

“Evolutionary and Structural Constraints Influencing Apolipoprotein A-I Amyloid Behavior”. GISONNO, R*; MASSON, T* y col, PROTEINS, 2021

<https://doi.org/10.1101/2020.09.18.304337>

* Co-primeros autores.

2.1 Resumen

La descripción poblacional de más de 70 variantes naturales de apoA-I con mutaciones puntuales asociadas a amiloidosis, a trastornos del transporte de colesterol o simplemente silenciosas, abre un estimulante desafío para nuestros estudios. Al momento, no es conocido un patrón claro entre las distintas variantes que permita inferir el comportamiento de la proteína, ya sea en la eficiencia de su función o en la tendencia a un plegamiento anómalo. Aunque varios estudios han profundizado en los impactos biofísicos y estructurales introducidos por estas mutaciones, hay poca información que aborde la relación entre las características evolutivas y estructurales que contribuyan al comportamiento amiloide de apoA-I.

A fin de utilizar una estrategia complementaria que permita contribuir a un concepto integral de la plasticidad estructural de la proteína combinamos estudios evolutivos, mutagénesis de saturación *in silico* y simulaciones de dinámica molecular (MD) para proporcionar un análisis completo de la conservación y el papel patogénico de las regiones propensas a la agregación (APR) presentes en apoA-I. El análisis de secuencia demostró que entre las cuatro regiones amiloidogénicas descritas para apoA-I humana, solo dos (APR1 y APR4) están conservadas evolutivamente en diferentes especies de *sarcopterygii*. Además, el análisis de estabilidad realizado con FoldX mostró que este motivo contribuye a la estabilidad marginal de apoA-I. Las propiedades estructurales del modelo apoA-I de longitud completa sugieren que la agregación se evita colocando APR en porciones rígidas y muy empaquetadas de su estructura nativa.

A continuación, nos dispusimos a estudiar el efecto de las mutaciones naturales en la conformación y estabilidad de las proteínas. En comparación con la deficiencia de HDL o variantes silenciosas naturales extraídas de la base de datos de gnomAD, el impacto termodinámico y patogénico de las mutaciones puntuales de apoA-I asociadas con patologías amiloides contribuye a un mayor efecto desestabilizador. Las simulaciones de MD de la variante de amiloide G26R evidenciaron el despliegue parcial del haz de la hélice α y la aparición de elementos secundarios de la hélice β en el extremo C de apoA-I, dando una posible pista sobre los primeros pasos involucrados en su agregación. Nuestros hallazgos destacan a APR1 como un componente relevante para la integridad estructural de apoA-I y enfatizan un efecto desestabilizador en las variantes amiloides que conducen a la exposición de las APR. Esta información contribuye a nuestra comprensión de cómo la apoA-I, con su alto grado de flexibilidad estructural, mantiene un delicado equilibrio entre su estructura nativa y la tendencia intrínseca a formar agregados amiloides.

2.2 Introducción

Las funciones de andamiaje de la apoA-I en la partícula HDL y sus múltiples interacciones proteína-proteína (Chroni y col. 2002; Manthei y col. 2020), la obligan a mantener una conformación dinámica y flexible (Gursky y Atkinson 1996). En contraste con estas funciones fisiológicas, varias mutaciones puntuales que afectan a la apoA-I se han asociado con patología amiloide hereditaria (Sipe y col. 2016). Estas mutaciones, como hemos mencionado en la introducción general, se distribuyen principalmente en dos “puntos calientes”, situados en la región N y C-terminal de la proteína, cada una con una manifestación clínica típica (Das y Gursky 2015). En síntesis, las mutaciones que ocurren en el extremo N (residuos 26-100) se caracterizan por depósitos de amiloide en el hígado y el riñón (Mucchiano y col. 2001; Obici y col. 2006), mientras que aquellas ubicadas en un dominio corto C-terminal (residuos 170-178) se asocian principalmente con depósitos en el corazón, la laringe y la piel (Gaglione y col. 2018). En la amiloidosis no hereditaria, la apoA-I de longitud completa se deposita en placas ateroscleróticas como fibrillas o formas seniles de amiloide. Este proceso se ha asociado con el envejecimiento, pero también se ha descrito en patologías crónicas como la enfermedad de Alzheimer y la diabetes mellitus tipo 2 (Westermarck y col. 1995).

El comportamiento amiloide del fragmento N-terminal de apoA-I se ha atribuido a la presencia de regiones propensas a la agregación (APR) en su secuencia y, específicamente, a una APR ubicada en esta región (Obici y col. 2006). Se ha planteado la hipótesis de que las mutaciones amiloidogénicas o modificaciones postraduccionales podrían promover la agregación a través de la desestabilización de la estructura proteica parcialmente desorganizada, seguido de la exposición de las APR (Obici y col. 2006). En este sentido, la mayoría de los estudios que abordan el efecto de las variantes amiloides se han centrado en las consecuencias biofísicas y fisiológicas de mutantes específicos. Sin embargo, nuestra comprensión de la relación entre los determinantes de la secuencia apoA-I y su proceso de agregación sigue sin estar clara. Con el objetivo de esclarecer este comportamiento, aplicamos distintas herramientas de bioinformática, a fin de predecir, no sólo el plegamiento general de la proteína con la secuencia nativa, sino para intentar entender la importancia relativa de las regiones APR sobre la estabilidad y la organización conformacional de las distintas variantes. Estas herramientas, de gran utilidad para estudios de conformación proteica, permiten acercarse a las hipótesis usando como pilar el conocimiento previo sobre cada proteína, volcado en bases de datos de secuencias y en algoritmos que se apoyan en la simulación de energías, naturaleza química de los aminoácidos, etc.

En la primera parte de este trabajo, a través de un análisis evolutivo, caracterizamos la conservación de regiones de agregación en un amplio conjunto de datos de secuencias de apoA-I de vertebrados, acotando el estudio a un grupo taxonómico cercano evolutivamente, como son los sarcopterigios. A continuación y utilizando la estructura de consenso de apoA-I con la secuencia completa descrita recientemente (Melchior y col. 2017), examinamos las propiedades estructurales que contribuyen a minimizar la exposición de sus APR constituyentes. Dado que sería esperable un efecto disímil en la desestabilización de las mutaciones sobre la conformación proteica, llevamos a cabo un análisis de mutagénesis por saturación *in silico* de apoA-I. De esta manera, pudimos evaluar los cambios en la estabilidad termodinámica que puedan inducir las mutaciones naturales. Utilizando simulaciones de dinámica molecular de las variantes de apoA-I estudiadas por el grupo, analizamos el impacto conformacional y dinámico de diferentes variantes amiloides en la estructura de apoA-I con la secuencia primaria completa. Esta información es relevante para comprender cómo una proteína marginalmente estable, pero metabólicamente activa, logra iniciar la formación de una estructura amiloide y desarrollar una patología grave. Además, nuestras medidas de estabilidad podrían usarse como una primera aproximación para interpretar el impacto estructural de nuevas mutaciones que afectan a apoA-I.

2. 3. Objetivos

2. 3. 1. Objetivo general

Utilizar herramientas bioinformáticas para analizar la relación entre las características evolutivas y estructurales que contribuyen al comportamiento amiloide de apoA-I.

2. 3. 2. Objetivos específicos

Analizar la conservación y el papel patogénico de las regiones propensas a la agregación (APR) presentes en apoA-I.

Simular el comportamiento de las variantes de apoA-I por dinámica molecular para evaluar parámetros estructurales.

Predecir la estabilidad termodinámica de las APR y de las variantes de apoA-I por mutagénesis *in silico*.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Análisis evolutivo de secuencias de apoA-I

Es posible reconstruir la historia evolutiva de un gen comparando las secuencias de genes pertenecientes a diferentes especies (Koonin 2005). Para reconstruir la historia de apoA-I se generó un conjunto completo de datos de secuencias mediante la recopilación de ortólogos de apoA-I disponibles en las bases de datos Ensembl y Refseq (O'Leary y col. 2015; Yates y col. 2019). Los ortólogos son genes derivados de un solo gen ancestral que normalmente realizan funciones equivalentes en los respectivos organismos (Koonin 2005).

Para excluir los datos de baja calidad, solo se mantuvieron las secuencias que no contenían caracteres ambiguos, que tuvieran un codón de partida de metionina (M) adecuado y que tuvieran más de 200 aminoácidos. Además, como Ensembl y Refseq tienen datos superpuestos para algunas especies, se empleó la herramienta de agrupamiento CD-HIT (Fu y col. 2012) para generar grupos de secuencias similares con un valor de corte de identidad de 0,98. CD-HIT es un programa ampliamente utilizado para agrupar secuencias biológicas a fin de reducir su redundancia y mejorar el rendimiento de otros análisis (Fu y col. 2012).

Nuestro conjunto de datos final comprendía 104 secuencias de proteínas que cubren el linaje *Sarcopterygii* de Vertebrata, con el objetivo de analizar especies cercanas evolutivamente. Se construyó un alineamiento de secuencia múltiple (MSA) a partir de las secuencias de proteínas utilizando un programa de alineamiento automatizado, ClustalO, con parámetros predeterminados (Sievers y col. 2011).

2.4.2 Modelado estructural comparativo de secuencias existentes de apoA-I

Los modelos estructurales de apoA-I basados en secuencias existentes se obtuvieron con el software Modeller (Šali y Blundell 1993). Se llevó a cabo un alineamiento entre las secuencias objetivo y molde para guiar el proceso de modelado y se seleccionó como referencia la estructura --*consenso de la apoA-I humana (Melchior y col. 2017). Los modelos en bruto obtenidos con Modeller se sometieron a un paso de minimización de energía utilizando FastRelax del programa de PyRosetta para muestrear conformaciones de baja energía que podrían parecerse al estado nativo de la proteína (Chaudhury, Lyskov, y Gray 2010). Las estructuras resultantes se visualizaron y alinearon con PyMol Molecular Graphics System, Versión 2.0 Schrödinger, LLC.

El nivel de empaquetado para el residuo i estuvo representado por su Número de contacto ponderado (WCN), que se calculó de la siguiente manera:

$$WCN_i = \sum_{i \neq j} \frac{1}{r_{ij}^2}$$

donde r_{ij} es la distancia entre el centro geométrico de los átomos de la cadena lateral para el residuo i y el residuo j . Los cálculos se llevaron a cabo utilizando una rutina bioinformática (script) personalizada, desarrollada por Sydykova y col. (Sydykova y col. 2018). La dinámica intrínseca de las proteínas se caracterizó mediante un modelo de simulación de grano grueso basado únicamente en la información topológica de las proteínas representada como un modelo de red gaussiana (GNM). En este enfoque, la estructura de la proteína se modela como una red de nodos (carbonos α) conectados por resortes. La resolución numérica de este modelo permite calcular el desplazamiento de equilibrio para todos los nodos (Fluctuación cuadrática media, MSF), describiendo los movimientos globales del sistema. Se utilizó el paquete ProDy (Bakan, Meireles, y Bahar 2011) para ajustar un GNM a la estructura de consenso de apoA-I. Seleccionamos los primeros diez modos lentos para el análisis y el trazado, ya que se han informado anteriormente como los principales determinantes de la dinámica global de la estructura de las proteínas (Kitao y Go 1999). Las interacciones de residuos presentes dentro de la estructura de apoA-I se calcularon utilizando dos enfoques diferentes, RING2 y Protein Contact Atlas (Kayikci y col. 2018; Piovesan, Minervini, y Tosatto 2016). En resumen, ambos métodos calculan todos los contactos de átomos no covalentes entre residuos y los utilizan para crear una red de contacto de residuos donde cada nodo representa un residuo de la proteína y los bordes entre los residuos indican la presencia de al menos un contacto atómico.

2.4.3 Conservación de regiones propensas a la agregación (APR)

Las secuencias de péptidos señal no fueron incluidas en el análisis del MSA, para retener solo la secuencia de la proteína madura. Se utilizó el software TANGO (Fernandez-Escamilla y col. 2004) para detectar las APR en el conjunto de datos de secuencias de proteínas. Este algoritmo predice la agregación beta utilizando una fase espacial en la que la proteína desplegada puede adoptar uno de cinco estados: espiral aleatoria, hélice α , giro β , agregación α -helicoidal o agregación de hoja beta. Es importante destacar que TANGO se basa en la suposición de que las regiones centrales de un agregado están completamente enterradas en la secuencia. Las predicciones se llevaron a cabo utilizando la configuración predeterminada: sin protección para el extremo C y el extremo N, pH 7, temperatura de 310°K y fuerza iónica de 0,1. Los archivos

de salida proporcionan una puntuación de agregación por posición específica; como se sugiere en el manual TANGO (Fernandez-Escamilla y col. 2004), las regiones contiguas que comprenden cinco o más residuos con una puntuación de al menos cinco se anotaron como APR. Para abordar el impacto de las mutaciones de un solo punto en la tendencia de agregación de apoA-I, ejecutamos TANGO para cada secuencia mutante y comparamos el perfil de puntuaciones con la secuencia de *tipo salvaje*. El software TANGO se descargó de <http://tango.crg.es> con licencia académica.

2.4.4 Impacto termodinámico de las variantes sin sentido de apoA-I

FoldX (Guerois, Nielsen, y Serrano 2002) implementa una función de energía empírica basada en términos significativos para la estabilidad de la estructura de la proteína. La energía libre de desnaturalización (ΔG) de la proteína incluye términos para interacciones de van der Waals, solvatación de residuos apolares y polares, enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, puentes de agua, interacciones electrostáticas y costo entrópico para el esqueleto carbonado y las cadenas laterales. Los cambios en la energía libre de plegamiento tras la mutación se calculan como la diferencia entre la energía de plegado (ΔG) estimada para los mutantes y las variantes de *tipo salvaje*. Aunque FoldX parece ser más preciso para la predicción de mutaciones desestabilizadoras y menos preciso para la predicción de mutaciones estabilizadoras, en ambos casos se demostró que FoldX es una herramienta valiosa para inferir sitios relevantes putativos para la estabilidad estructural. FoldX 5 se descargó de <http://foldxsuite.crg.eu/academic-license-info>. Empleamos el software MutateX (Tiberti y col. 2019) para automatizar la predicción de $\Delta\Delta G$ asociados con la mutación sistemática de cada residuo disponible dentro de apoA-I, mediante el empleo de la función de energía FoldX. Los pasos básicos implican la reparación de la estructura del banco de datos de proteínas (PDB) (que implica la minimización de la energía para eliminar las interacciones desfavorables), la construcción de modelos para las variantes mutantes, los cálculos de energía para las estructuras mutantes y de *tipo salvaje*, y el resumen de las diferencias medias de energía libre estimadas.

2.4.5 Puntuación de patogenicidad de variantes de sentido erróneo

La herramienta de predicción Rhapsody (Ponzoni y col. 2020) consiste en un clasificador que combina características basadas en secuencia, estructura y dinámica asociadas con una variante de aminoácido determinada y se entrena sobre un conjunto de datos completo de variantes de sentido erróneo anotadas en humanos. Las características dinámicas incluyen: fluctuaciones cuadráticas medias del residuo en el sitio de la mutación, que estima la flexibilidad conformacional

local; eficacia/sensibilidad de exploración de respuesta a perturbaciones, teniendo en cuenta las posibles respuestas alostéricas que implican el sitio de la mutación, y la rigidez mecánica en la posición de la secuencia del residuo mutado. Estas propiedades se calculan a partir de representaciones de Elastic Network Models (ENM) de estructuras de proteínas que describen la topología de contacto entre residuos en un formato compacto y computacionalmente eficiente que se presta a una solución analítica única para cada estructura. El algoritmo se actualizó recientemente para incluir características coevolutivas calculadas en dominios conservados descritos en la base de datos Pfam, y el conjunto de datos de entrenamiento se expandió y perfeccionó aún más. Este último combina variantes humanas anotadas de varios conjuntos de datos disponibles públicamente (Humvar, ExoVar, predictSNP, VariBench, SwissVar, Humsavar y ClinVar de Uniprot). Todos los análisis se realizaron utilizando el servidor Rhapsody <http://rhapsody.csb.pitt.edu/>

2.4.6 Simulaciones de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de grano grueso con el campo de fuerza SIRAH (Machado y col. 2019) y el paquete de software GROMACS 2018.4 (Abraham y col. 2015). Empleamos el modelo de consenso de apoA-I humana en su estado monomérico y libre de lípidos, propuesto por Davidson y col. (Melchior y col. 2017). El archivo PDB se descargó de la página de inicio de Davidson Lab (<http://homepages.uc.edu/~davidswm/structures.html>). El mapeo de representaciones atómicas de grano grueso se realizó con un script Perl incluido en SIRAH Tools (Machado y Pantano 2016). Los mutantes G26R, L60R, R173P y K107del se generaron con Chimera (Pettersen y col. 2004), editando las coordenadas del archivo pdb del modelo de consenso. Para el caso del mutante de delección, eliminamos Lys107 y conectamos los residuos Lys106 y Trp108 con un segmento no estructurado usando Modloop (Fiser y Sali 2003). La apoA-I de tipo salvaje y los sistemas mutantes se ensamblaron utilizando la siguiente configuración: la proteína se colocó dentro de una caja de simulación de octaedro definida estableciendo una distancia de 1,5 nm entre el soluto y los bordes de la caja. Los sistemas se solvataron estableciendo una concentración de NaCl 150 mM siguiendo el protocolo propuesto por Machado (Machado y Pantano 2020). Los pasos de minimización de energía y calentamiento se realizaron siguiendo el protocolo recomendado por Machado y col. (Machado y col. 2019) utilizando restricciones posicionales en la columna vertebral de la proteína para garantizar la relajación de la cadena lateral, especialmente en los modelos mutantes. Las corridas de producción se realizaron por quintuplicado en ausencia de cualquier restricción posicional, generando trayectorias de 1 μ s a 310 K utilizando un conjunto NPT de 1 barra.

El análisis estructural se realizó con las herramientas GROMACS `gmx rmsf`, `gmx gyrate` y `gmx sasa`. Se calculó la fluctuación cuadrática media para cada residuo alineando las coordenadas de apoA-I de la trayectoria completa con los modelos iniciales. El radio de giro y las superficies accesibles al disolvente (SASA) se obtuvieron promediando los valores correspondientes a los últimos 0,1 μ s de simulación. Los cálculos de SASA se midieron en cuatro regiones propensas a amiloide, que comprenden los residuos 14-19 (APR1), 53-58 (APR2), 67-72 (APR3) y 227-232 (APR4).

2.4.7 Disponibilidad de código y archivos

Todos los paquetes de Python utilizados se instalaron a través del administrador de entorno de Conda. Un archivo de requisitos está disponible en el repositorio de este proyecto para instalar las dependencias utilizadas en nuestro análisis. El administrador de flujo de trabajo Snakemake se utilizó en el análisis evolutivo para ganar reproducibilidad y consistencia de los resultados (Koster y Rahmann 2012). Los datos, los scripts Snakefile y Python utilizados en este capítulo están disponibles en https://github.com/tomasMasson/APOA1_evolution.

2.4.8 Visualizaciones y análisis estadísticos

Se utilizó la biblioteca Scipy Python para la manipulación de datos y todos los análisis estadísticos (Virtanen y col. 2020). La significancia estadística se determinó utilizando la prueba U de Mann-Whitney para la comparación del impacto de la variante y la prueba de Student para observables MD. Los gráficos MD se presentan como medias \pm desviación estándar derivadas de cinco experimentos independientes. Todas las visualizaciones se prepararon con la biblioteca Seaborn (Waskom y col. 2020).

2.5 Resultados

2.5.1 Evolución molecular de las regiones de agregación de apoA-I dentro de *Sarcopterygii*

La agregación de proteínas a través de la exposición de determinadas regiones cortas de su secuencia se ha asociado con una amplia gama de enfermedades humanas, en particular la amiloidosis. En el caso de apoA-I, como hemos mencionado anteriormente, se la ha relacionado con la formación de placas amiloideas y ateroscleróticas, pero sigue sin conocerse un mecanismo detallado del proceso amiloidogénico. Dado que apoA-I tiene cuatro APR previamente caracterizadas (residuos 14-19 para APR1, 53-58 para APR2, 67-72 para APR3 y 227-232 para APR4), nos preguntamos si estas regiones amiloides podrían ser relevantes para la funcionalidad de la proteína, a pesar de su conocido papel patogénico (Louros y col. 2015). Para abordar esta cuestión, en primer lugar, decidimos explorar la conservación evolutiva de estos motivos dentro de las secuencias de apoA-I de organismos sarcopterigios. Nuestro análisis se limitó a este grupo para cubrir una amplia gama de especies a lo largo de la historia evolutiva de esta proteína, pero también excluyendo grupos con grandes tiempos de divergencia que podrían confundir nuestros resultados (Yousaf, Raza, y Abbasi 2015). Recopilamos nuestras secuencias de la base de datos Ensembl y construimos un MSA (Figura 1) para identificar las APR presentes en otras especies en función de las secuencias informadas anteriormente para la especie humana. Como se observa en las secuencias alineadas (Figura 2.1) es evidente la existencia de numerosos residuos conservados.

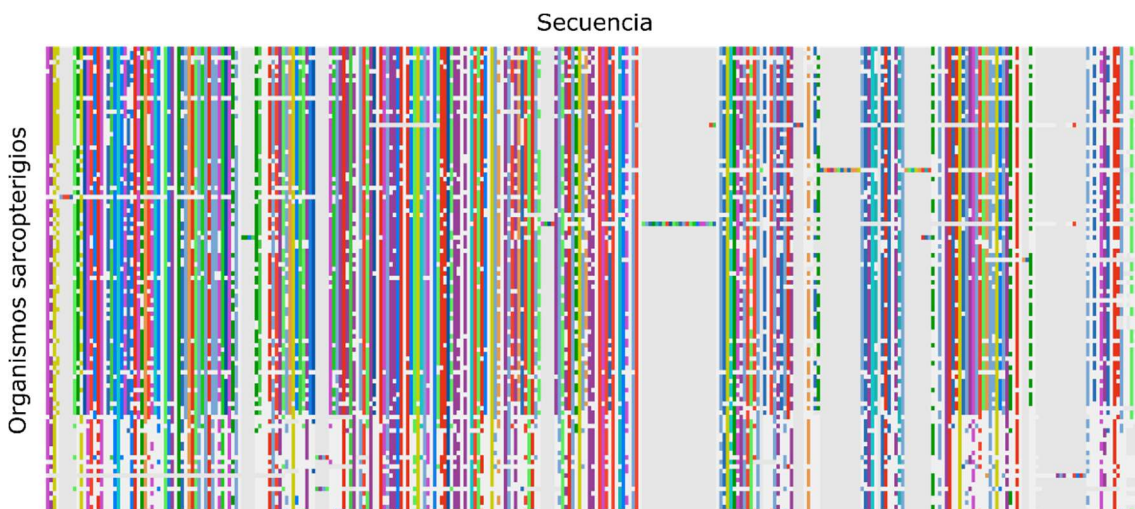


Figura 2.1. Esquema del alineamiento de secuencias, dónde está coloreado el consenso de aminoácidos, las posiciones que difieren se muestran en color blanco y los gaps en gris.

Empleamos el software Tango para predecir la propensión a la agregación basada en la secuencia de cada una de las APR. Nuestros resultados de amiloidogenicidad para los cuatro APR sugieren que APR1 y APR4 han conservado su comportamiento amiloide en más del 60% y 40% de las secuencias del conjunto de datos, respectivamente. Por otro lado, APR2 y APR3 presentaron un comportamiento de no agregación en prácticamente todas las secuencias (Figura 2.2.A).

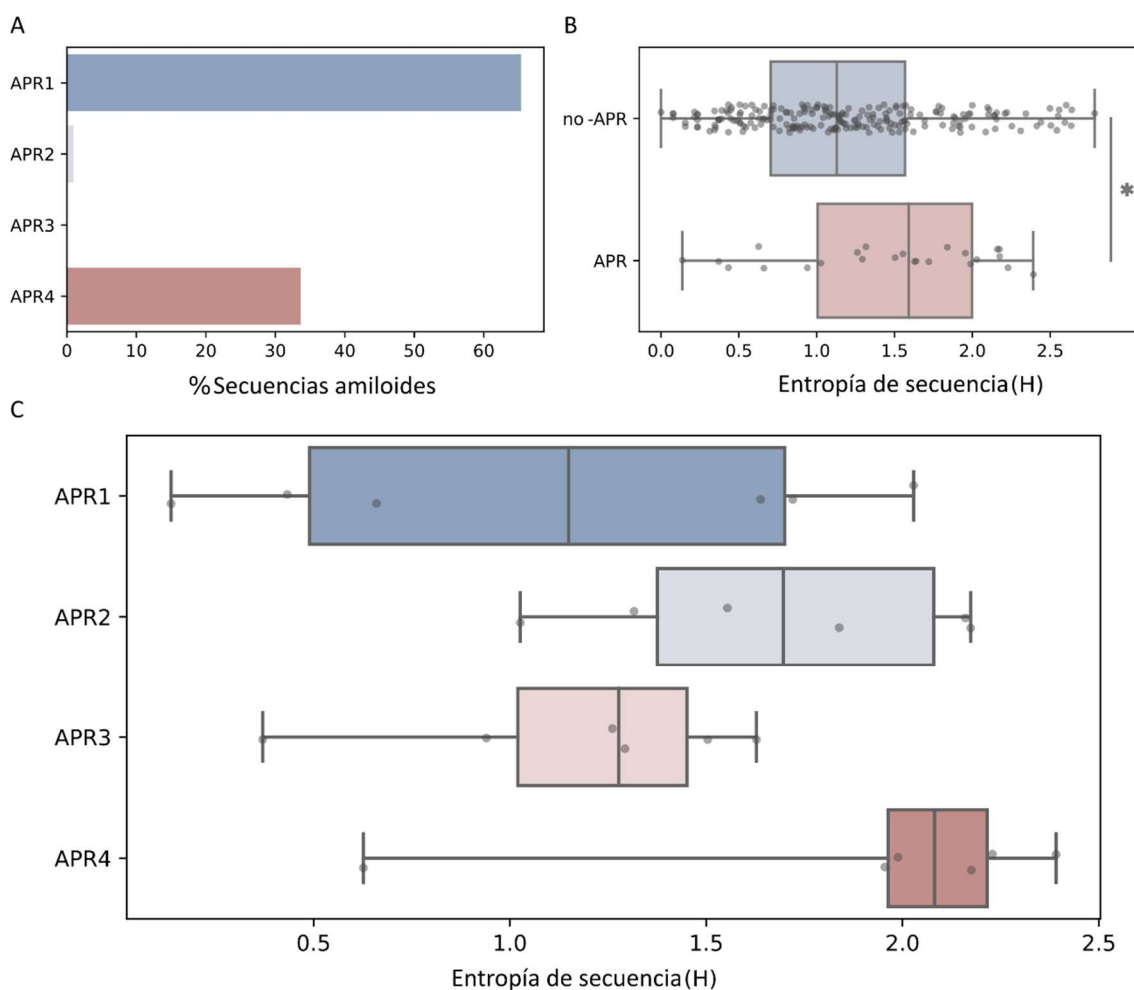


Figura 2.2. Conservación evolutiva de las APR dentro de las secuencias de apoA-I. **A** Porcentaje de secuencias en nuestro conjunto de datos que se describen como amiloidogénicas según Tango (puntuación media superior al 5%). **B** Entropía de secuencia (H) calculada para cada residuo perteneciente a una secuencia amiloide o no (valor de $P = 0,018$, prueba U de Mann-Whitney). **C** Entropía de secuencia (H) calculada para cada residuo de las APR.

Los datos mostraron que la entropía de estos residuos en promedio es significativamente mayor que el valor H promedio para los residuos de apoA-I que no forman parte de ninguna APR, (valor de $P = 0.018$, prueba U de Mann-Whitney). Esto implica que dichas secuencias amiloides están evolutivamente menos conservadas que el resto de la secuencia (Figura 2.2.B). De hecho, si calculamos los valores de H para cada residuo en las APR parecen ser diferentes entre sí, y la APR1, con un valor H en promedio menor, tiene la mayor conservación de secuencia (Figura 2.2.C). En conjunto estos datos indican que la APR1 es entre las APR la región más esencial en la organización de apoA-I. Posteriormente calculamos la conservación de la secuencia del MSA en función de la entropía de Shannon (H). Llevamos a cabo un análisis del alineamiento de la proteína y sus secuencias ortólogas para encontrar columnas que se conservan preferentemente. Se presume que estos sitios son funcionales o estructuralmente importantes porque han aceptado menos mutaciones en relación con el resto de la alineación. H es una de las medidas de conservación más simples y comunes en un sitio, ampliamente aceptada (Capra y Singh 2007).

2.5.2 Modelado estructural de secuencias existentes de apoA-I

Dado el comportamiento amiloide conservado de APR1 y APR4, y aunque su conservación de secuencia no fue tan fuerte, decidimos expandir estos resultados con información derivada de datos estructurales de diferentes proteínas. Implementamos un enfoque de modelado comparativo para contrastar estructuras de apoA-I correspondientes a varias secuencias existentes, incluidos anfibios (*Xenopus tropicalis*), reptiles (*Crocodylus porosus* y *Chelonoidis abingdonii*), aves (*Gallus gallus*) y mamíferos (*Bos taurus*, *Canis lupus* y *Mus musculus*).

Hasta la fecha, la estructura más completa y disponible para apoA-I está depositada en la página web del laboratorio del Dr. Davidson, por lo que la usamos como plantilla para nuestro modelado basado en homología. Usamos Modeller para generar un modelo estructural para cada secuencia objetivo y luego realizamos un paso de minimización de energía basado en el protocolo FastRelax de PyRosetta. Una alineación estructural de las proteínas modeladas enfatizó que, aunque la estructura general de apoA-I se conserva entre las especies existentes, muestran una variabilidad conformacional significativa, principalmente fuera de la región del paquete de hélice (Figura 2.3.A).

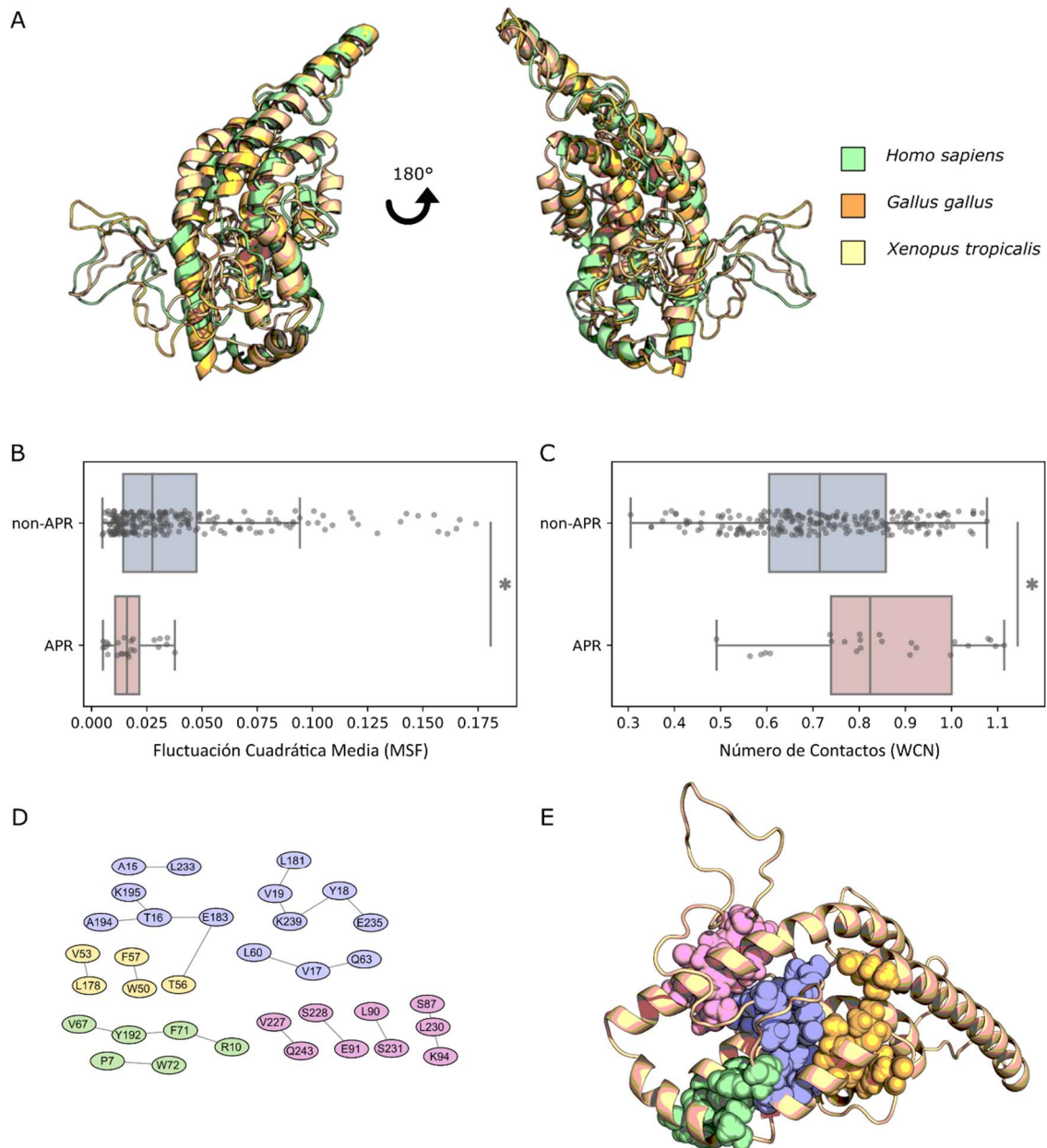


Figura 2.3. Propiedades dinámicas y estructurales de APR dentro de estructuras apoA-I. **A** Alineación de estructuras modeladas correspondientes a secuencias de apoA-I existentes. **B** Fluctuación cuadrática media (MSF; valor $P = 1,69 \times 10^{-4}$) y **C** número de contacto ponderado (WCN; valor $P = 1,23 \times 10^{-3}$), correspondientes a los residuos APR y no APR de las secuencias analizadas. **D** Red de contactos de residuos que involucran a las APR. **E** Mapeo estructural de contactos APR. Se observa en lavanda la APR1, en amarillo la APR2, en verde la APR3 y la rosa la APR4.

Usamos estos modelos estructurales para explorar más a fondo los niveles de fluctuaciones intrínsecas y los números de contacto de los residuos que componen las

APR de apoA-I. Nuestros resultados mostraron que los residuos de APR tienen valores de MSF significativamente más bajos en comparación con la distribución de valores para los residuos que no son de APR de apoA-I (Figura 3B, valor de $P = 1,69 \times 10^{-4}$, prueba U de Mann-Whitney). En una tendencia similar, los valores WCN también mostraron que los sitios APR están consistentemente rodeados por un mayor número de residuos que el sitio no APR de apoA-I (Figura 3C, valor $P = 1.25 \times 10^{-3}$, prueba U de Mann-Whitney). En este contexto estructural, los residuos de APR se integran en porciones relativamente rígidas y densamente empaquetadas de apoA-I, un sello distintivo de los sitios funcionalmente relevantes para la estructura de la proteína (Liu y Bahar 2012). Con el objetivo de obtener una comprensión más profunda de las interacciones moleculares que estabilizaron cada APR dentro de la estructura de apoA-I, utilizamos servidores Protein Contact Atlas y RING2 (Kayikci y col. 2018; Piovesan, Minervini, y Tosatto 2016) para reconstruir la red de interacción de residuos de cada APR (Figura 3D). Con base en estos datos, la APR1 mostró el mayor número de contactos de residuos, estableciendo interacciones con la hélice H3 (residuos 54-64) y 2 regiones diferentes del C-terminal (residuos 183-195 y 235-239); este grupo de interacciones está profundamente enterrado dentro del paquete de hélice α de apoA-I. En contraste, las otras APR mostraron un número menor de contactos, que comprenden residuos más localizados y expuestos a solventes. Tomando todos estos datos en conjunto, aunque todas las APR parecen caracterizarse por una baja movilidad y un entorno molecular altamente coronado, la APR1 parece ser el mayor contribuyente a las interacciones moleculares presentes dentro de la región del haz de hélice α de apoA-I.

Curiosamente, todas las estructuras modeladas conservaron perfiles similares de dinámica intrínseca, representada por la fluctuación cuadrática media (MSF) de los carbonos α de la estructura de la proteína, y el número de contacto ponderado (WCN), una medida de cuán coronado está el entorno molecular de un residuo (Figura 2.3). Esto sugiere que además de su heterogeneidad conformacional, las estructuras de apoA-I han conservado su dinámica intrínseca general. En la Figura 2.4 se observan estas medidas para cada posición de la secuencia de las estructuras modeladas.

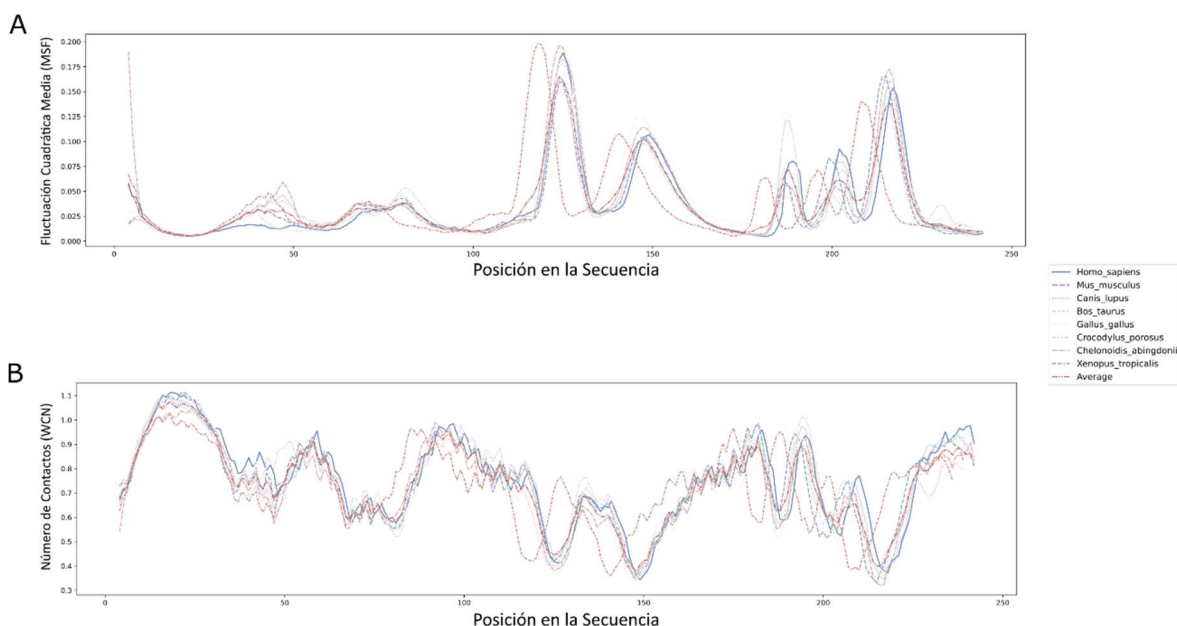


Figura 2.4. **A** Perfiles de fluctuación cuadrática media (MSF) y **B** número de contacto ponderado (WCN) calculados para cada estructura modelada.

2.5.3 Las variantes asociadas a amiloidosis tienen un efecto desestabilizador sobre la estructura del monómero apoA-I

Para comprender mejor la contribución termodinámica de las APR a la estabilidad estructural de la apoA-I, perfilamos el efecto termodinámico y patológico de cada posible mutación puntual única en la secuencia de la apoA-I mediante mutagénesis por saturación *in silico*. El efecto desestabilizador de cada posible mutación en la secuencia de apoA-I, representada por la diferencia en energía libre ($\Delta\Delta G$) entre la estructura *wild type* y mutante, se midió utilizando el campo de fuerza empírico FoldX y la rutina bioinformática MutateX (Figura 2.5). Como se observa, hay residuos que se predicen más críticos de substituir, ya que su reemplazo por la mayor parte de los aminoácidos induciría un efecto desestabilizante (por ejemplo, la Gly26). Un examen más detallado reveló que la estructura de apoA-I es muy sensible a mutaciones en la región 7-28. Para complementar este enfoque, se estimó el impacto de la patogenicidad de las mutaciones utilizando Rhapsody (Figura 2.6). En concordancia con lo observado en la figura previa, la región N terminal parece ser más sensible a mutaciones que induzcan una conformación con mayor grado de patogenicidad.

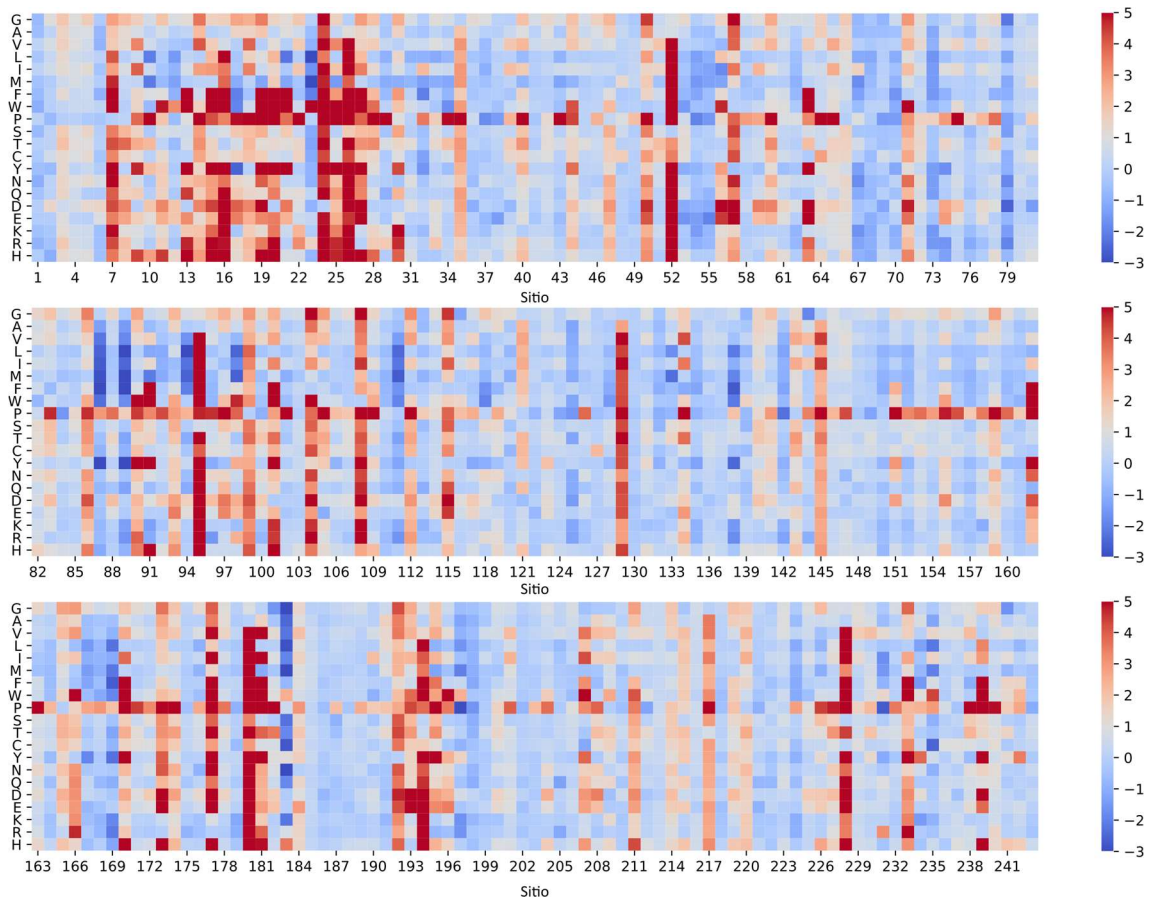


Figura 2.5. Mapa de calor de la desestabilización termodinámica de apoA-I. Valores de $\Delta\Delta G$ obtenidos por mutagénesis de saturación *in silico* de la estructura de apoA-I utilizando el motor FoldX. La mutación introducida se representa en el eje Y. Las escalas de la derecha indican los valores de $\Delta\Delta G$ expresados en kcal/mol.

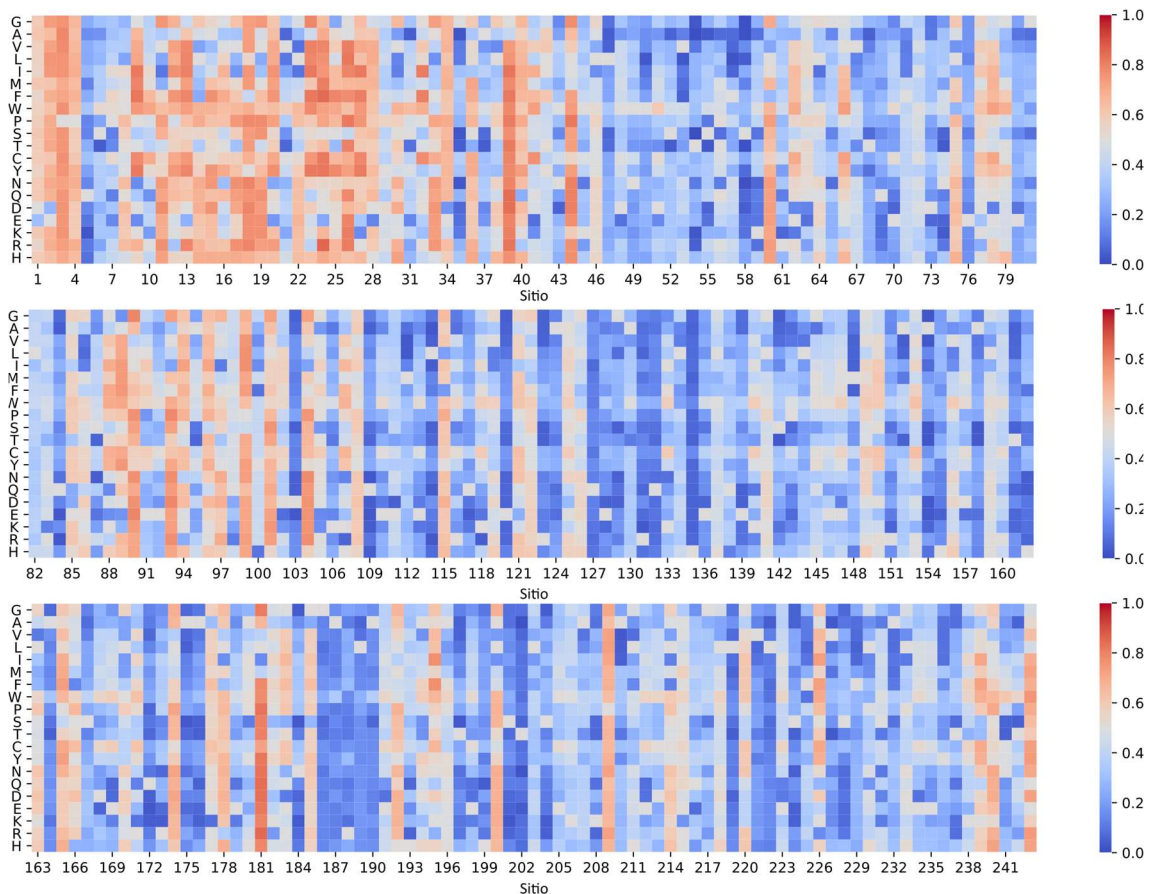


Figura 2.6. Mapa de calor de la patogenicidad de apoA-I. Valores de patogenicidad obtenidos mediante mutagénesis por saturación *in silico* de la estructura de apoA-I utilizando el paquete Rhapsody. La mutación introducida se representa en el eje Y. Las escalas de la derecha indican la puntuación de patogenicidad (1 más patógeno, 0 menos patógeno)

A pesar del efecto diferencial determinado arriba para la sustitución de cada aminoácido, pudimos observar que la distribución de $\Delta\Delta G$ de la mayoría de las variantes tenían un impacto moderado en la estabilidad de apoA-I ($-1 \text{ kcal / mol} < \Delta\Delta G < 1 \text{ kcal / mol}$) (Figura 2.7.A), los valores de $\Delta\Delta G$ que comprenden a la APR1 son los más elevados (Figura 2.7.B). Las predicciones de Rhapsody también apoyan esta región como un segmento sensible a la mutación de la estructura apoA-I (Figura 2.7.C). Este resultado sugiere que la conservación de APR1 en apoA-I podría ser necesaria para mantener la estabilidad termodinámica marginal del paquete de hélice α a pesar del riesgo de sufrir agregación. De acuerdo con nuestras observaciones, se ha propuesto recientemente que las APR desempeñan un papel estabilizador en la estructura de la proteína (Langenberg y col. 2020).

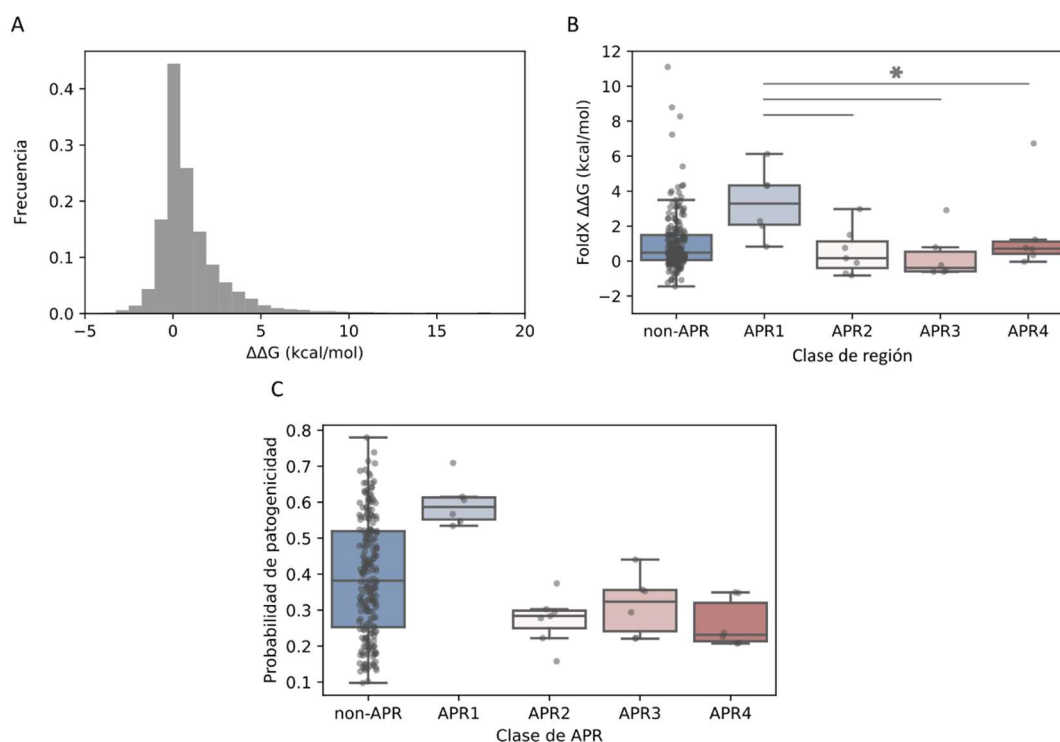


Figura 2.7. La APR1 contribuye a la estabilidad del paquete de hélices α en apoA-I. La estabilidad estructural de la proteína se cuantificó utilizando el motor FoldX. La diferencia de energía libre ($\Delta\Delta G$) se calculó por comparación entre la distribución de valores de energía de la secuencia mutante y salvaje. **A** $\Delta\Delta G$ correspondiente a todas las posibles mutaciones. **B** Valores de la diferencia de energía libre ($\Delta\Delta G$) calculados para cada una de las posiciones de secuencias pertenecientes a las APR y no-APR. **C** Valores de la patogenicidad calculados para cada una de las posiciones de secuencias pertenecientes a las APR y no-APR.

Mediante el análisis de predicciones de TANGO sobre las diferentes secuencias mutantes de apoA-I, determinamos que las variantes amiloidogénicas no modifican la tendencia de agregación intrínseca de las APR (Tabla 2.1). Por ello, decidimos investigar el impacto de estas variantes en la estabilidad de la apoA-I. Usamos valores de $\Delta\Delta G$ para resaltar las diferencias entre las variantes patogénicas asociadas con la enfermedad amiloide (Gogonea 2016a) y las variantes naturales reportadas por el proyecto gnomAD (Karczewski y col. 2020). Nuestros resultados evidenciaron que las mutaciones amiloides tenían un efecto desestabilizador y una puntuación de patogenicidad significativamente mayor en comparación con las variantes naturales en pacientes sanos (Figura 8A y 8B), lo que sugiere un vínculo estrecho entre la desestabilización estructural de la conformación nativa de apoA-I y la aparición de patología amiloide. Dado el hecho de que un pequeño grupo de variantes en la base de datos de gnomAD mostró un impacto elevado en la estabilidad de la proteína ($> 2 \Delta\Delta G$ kcal / mol), decidimos investigar con

qué frecuencia ocurren a nivel de población. El espectro de frecuencia (Figura 2.8.C) mostró que dichas variantes altamente desestabilizantes estaban presentes a bajas frecuencias, minimizando así su efecto deletéreo en la población. Por el contrario, las variantes con mayor frecuencia en nuestro conjunto de datos tuvieron un efecto casi neutral sobre la estabilidad. Cabe señalar que, si bien gnomAD excluyó de sus cohortes a sujetos con enfermedades mendelianas y pediátricas, no podemos descartar la posibilidad de que algunas de estas variantes desestabilizadoras correspondan a patologías no diagnosticadas.

Tabla 2.1. Puntaje de agregación calculado por TANGO para cada una de las APR de apoA-I Wt y sus variantes puntuales amiloidogénicas.

Variante	Puntaje de agregación	APR
Wt	352.767	APR1
G26R	352.767	APR1
E34K	352.767	APR1
W50R	352.767	APR1
L60R	352.767	APR1
L64P	352.767	APR1
F71Y	352.767	APR1
L75P	352.767	APR1
L90P	352.767	APR1
L170P	352.767	APR1
R173P	352.767	APR1
L174S	352.767	APR1
A175P	352.767	APR1
L178H	352.767	APR1
L178P	352.767	APR1
L178R	352.767	APR1
K238N	352.767	APR1
Wt	6.44347	APR2
G26R	6.44347	APR2
E34K	6.44347	APR2
W50R	6.44347	APR2
L60R	6.44347	APR2
L64P	6.44347	APR2
F71Y	6.44347	APR2
L75P	6.44347	APR2

L90P	6.44347	APR2
L170P	6.44347	APR2
R173P	6.44347	APR2
L174S	6.44347	APR2
A175P	6.44347	APR2
L178H	6.44347	APR2
L178P	6.44347	APR2
L178R	6.44347	APR2
K238N	6.44347	APR2
Wt	o	APR3
G26R	o	APR3
E34K	o	APR3
W50R	o	APR3
L60R	o	APR3
L64P	o	APR3
F71Y	o	APR3
L75P	o	APR3
L90P	o	APR3
L170P	o	APR3
R173P	o	APR3
L174S	o	APR3
A175P	o	APR3
L178H	o	APR3
L178P	o	APR3
L178R	o	APR3
K238N	o	APR3
Wt	32.6745	APR4
G26R	32.6745	APR4
E34K	32.6745	APR4
W50R	32.6745	APR4
L60R	32.6745	APR4
L64P	32.6745	APR4
F71Y	32.6745	APR4
L75P	32.6745	APR4
L90P	32.6745	APR4
L170P	32.6745	APR4
R173P	32.6745	APR4

L174S	32.6745	APR4
A175P	32.6745	APR4
L178H	32.6745	APR4
L178P	32.6745	APR4
L178R	32.6745	APR4
K238N	32.6745	APR4

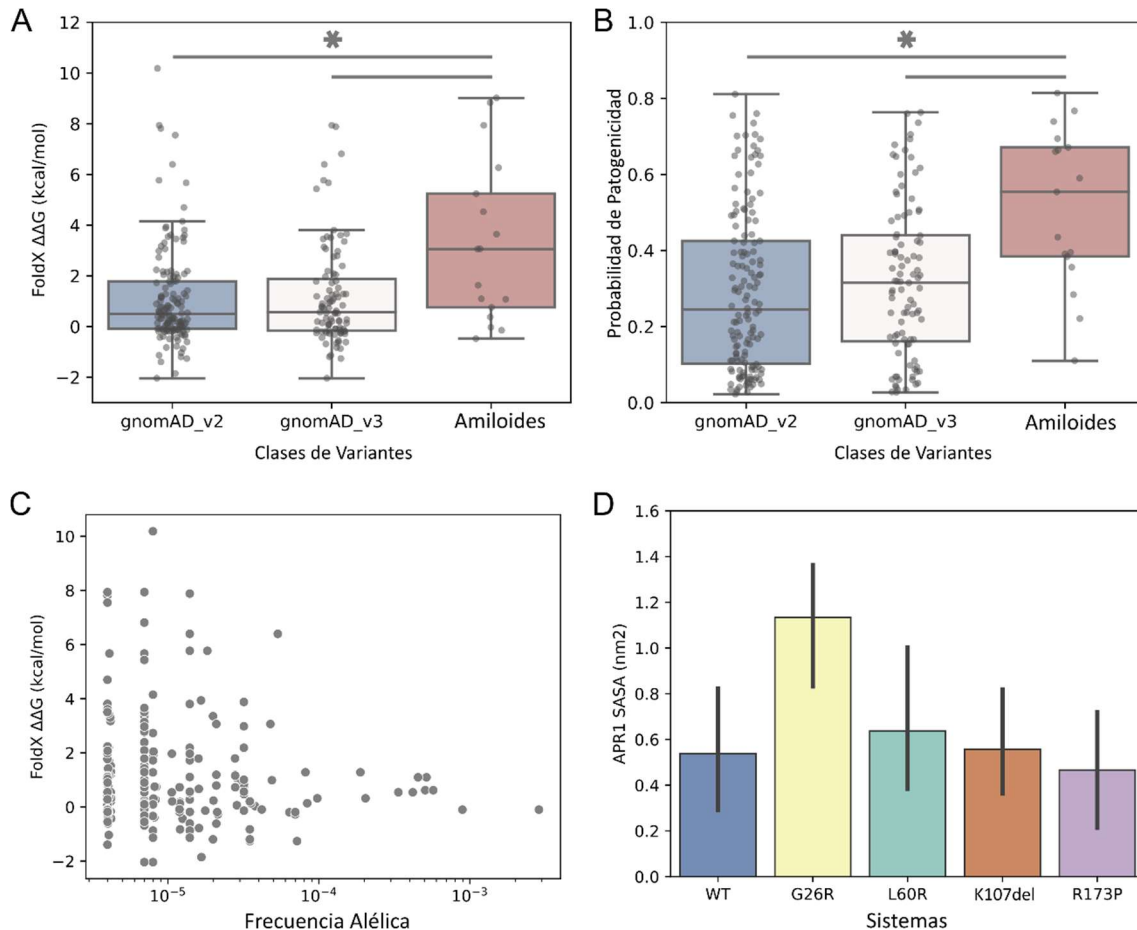


Figura 2.8. Impacto de las variantes de apoA-I en la estabilidad y función de las proteínas **A - B** Diferencia de energía libre ($\Delta\Delta G$) y distribuciones de patogenicidad de Rhapsody para las clases de variantes de amiloide y gnomAD (valor de $P < 0,01$, prueba U de Mann-Whitney). **C** Distribución de frecuencia de alelos para variantes de gnomAD frente a su efecto predicho sobre la estabilidad de la proteína. **D** Simulaciones de dinámica molecular de mutantes apoA-I de longitud completa. Área de superficie accesible al solvente (SASA) calculada para el APR1 (residuos 14-19). El sistema G26R mostró una mayor exposición a APR1 en comparación con el sistema de tipo salvaje (valor de $P < 0.05$ Prueba de Student).

2.5.4 Simulación de dinámica molecular de mutantes apoA-I

Para complementar nuestros resultados anteriores que muestran el efecto desestabilizador de las variantes amiloides, decidimos estudiar las propiedades dinámicas de algunos de los mutantes amiloides de apoA-I mediante la realización de simulaciones de dinámica molecular de grano grueso bajo el campo de fuerza SIRAH. Seleccionamos cuatro mutantes (G26R, L60R, K107del y R173P) previamente caracterizados por nuestro grupo (Gaddi y col. 2020; Gisonno y col. 2020; Ramella y col. 2012; Rosú y col. 2015), más la proteína Wt, para preparar nuestros sistemas de simulación. Nuestra selección también aseguró que las mutaciones se distribuyeran por toda la secuencia de apoA-I. En primer lugar, exploramos la dinámica general de nuestros sistemas mediante su desviación cuadrática media (RMSD). La estructura de consenso descrita recientemente para apoA-I se utilizó como coordenadas de referencia para los cálculos de RMSD. Observamos una gran variabilidad en los valores de RMSD para todos los sistemas (5.4-10 Å) durante nuestra simulación de 1 μ s, lo que podría estar relacionado con la estructura altamente dinámica y marginalmente estable propuesta para apoA-I y está de acuerdo con la alineación estructural de nuestras estructuras modeladas. No evidenciamos diferencias significativas entre los valores de RMSD de los diferentes sistemas (Tabla 2.2), lo que sugiere que el impacto de las mutaciones puntuales es insignificante en comparación con la dinámica intrínseca de la columna vertebral. Dada la variabilidad estructural evidenciada por RMSD, decidimos calcular MD observables durante los últimos 100ns de las simulaciones. Las fluctuaciones cuadráticas medias específicas de la posición (RMSF) para cada uno de los sistemas estudiados mostraron que las regiones de bucle 120-150 y 180-200 son las regiones más flexibles en apoA-I, mientras que el paquete de hélice α N-terminal mantuvo una estructura más compacta durante el tiempo de simulación (Figura 2.9).

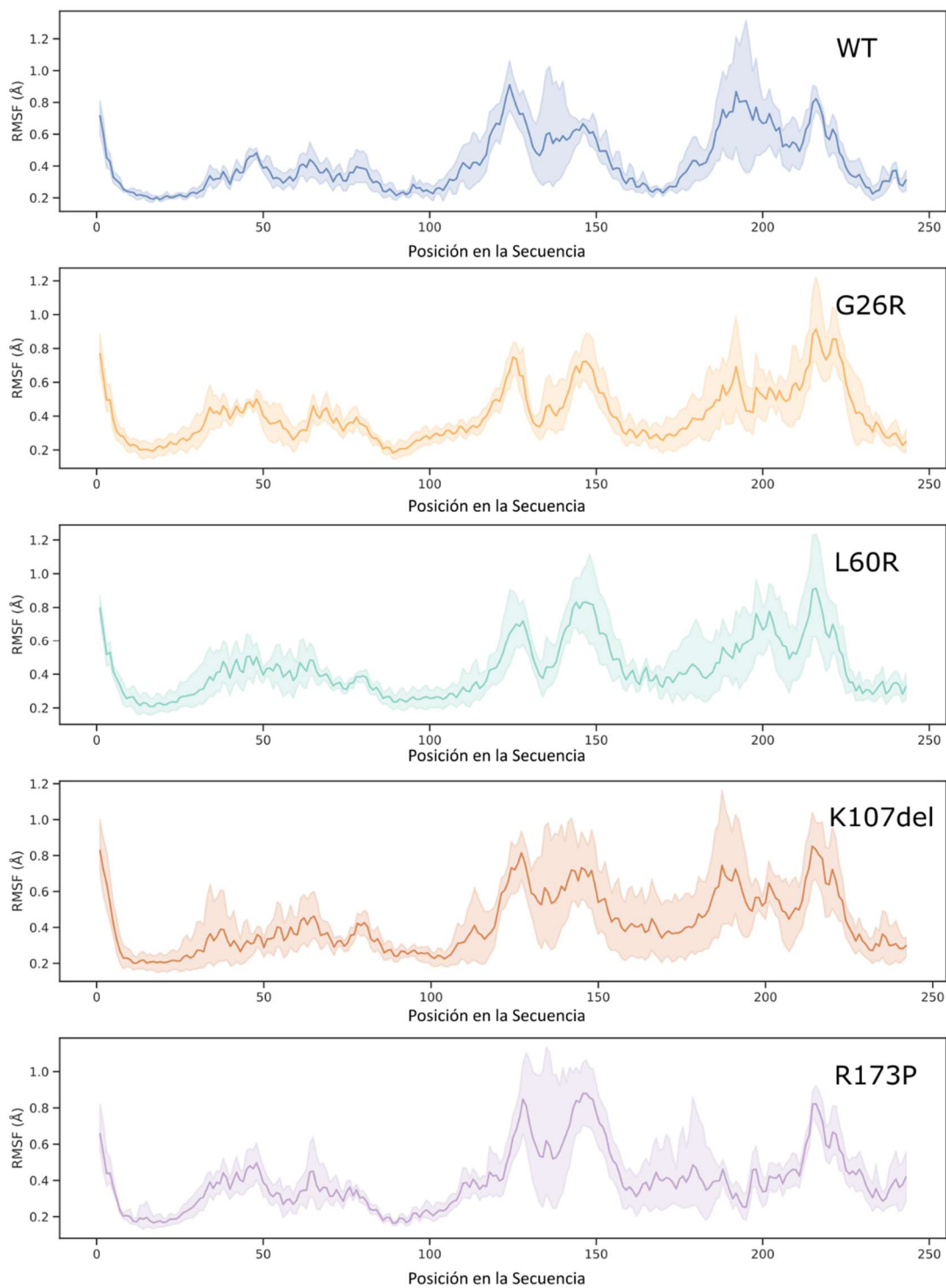


Figura 2.9. Fluctuaciones cuadráticas medias específicas de la posición (RMSF) para cada uno de los sistemas estudiados.

Sistema	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Media	Desviación estándar
Wt	7.91	7.24	8.04	5.39	7.92	7.3	1.11
G26R	6.75	10.33	7.54	7.65	6.1	7.67	1.61
L60R	6.61	6.11	10.28	8.3	7.87	7.83	1.63
K107del	7.28	6.84	7.77	6.03	8.79	7.34	1.03
R173P	8.97	8.24	7.14	6.91	8.16	7.88	0.85

Tabla 2.2. Valores de RMSD de las cinco réplicas para cada uno de las variantes de apoA-I. Se calculó la media y el desvío. No se evidenciaron diferencias significativas entre los diferentes sistemas.

Estos resultados concuerdan bien con los valores de MSF calculados con el modelo GNM, reforzando el perfil dinámico obtenido para apoA-I. Los perfiles de fluctuación similares entre la apoA-I de tipo salvaje y los mutantes mencionados anteriormente sugieren que las mutaciones no introducen cambios dinámicos importantes, al menos durante el período de tiempo de simulación.

Exploramos el posible papel de las mutaciones en la agregación amiloide de apoA-I de longitud completa mediante el análisis del área de superficie accesible al solvente (SASA) de cada APR en nuestros cinco sistemas. Observamos un aumento significativo en la exposición al solvente de APR1 en el sistema G26R en comparación con el sistema de tipo salvaje, lo que sugiere que algunas variantes de amiloide podrían conducir a la exposición al solvente de las regiones de agregación (Figura 2.8.D). Además, se observó la formación de una estructura de lámina β en el APR4 durante las simulaciones del sistema G26R (Figura 2.10). El bajo impacto de las variantes L60P, K107del y R173P sobre la exposición a APR sugiere que estos mutantes podrían afectar a otras regiones de la estructura de apoA-I o pueden requerir modificaciones postraduccionales adicionales para experimentar la agregación amiloide.

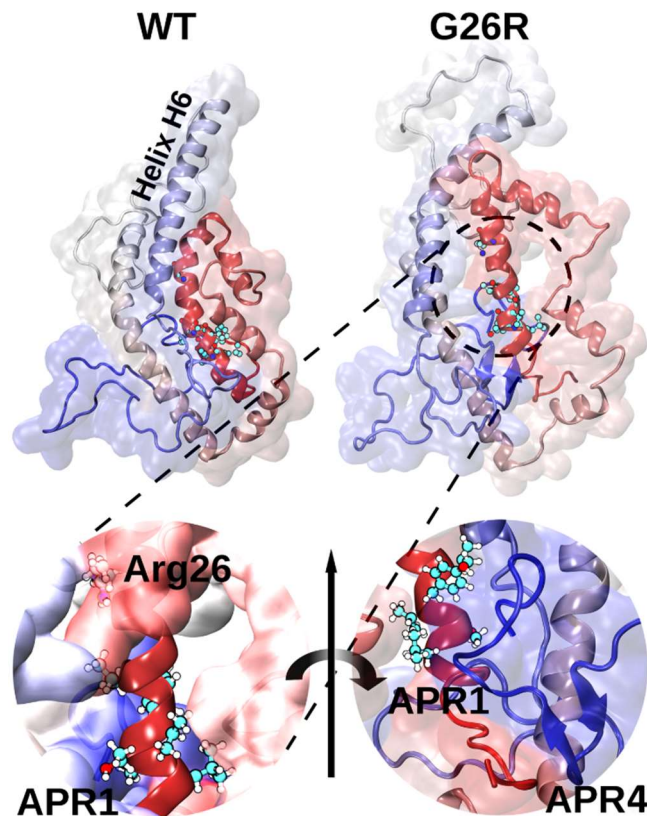


Figura 2.10. Representación gráfica del modelo de consenso (WT) y una imagen instantánea final de una de las réplicas simuladas para el mutante G26R. La sustitución de glicina por arginina en la posición 26 desestabiliza el haz de la hélice, expulsando la hélice H6 con la exposición al disolvente concomitante de APR1 (recuadro izquierdo). Una rotación de vista de 180° muestra la horquilla de hoja β formada entre los residuos S224 y A232, correspondiente al APR4 (recuadro derecho).

2.6 Discusión

El mecanismo molecular de la agregación amiloide ligado a apoA-I sigue siendo en gran parte desconocido debido a la limitada información estructural dada su plasticidad conformacional inherente (Gursky y Atkinson 1996). En este capítulo de tesis nos basamos en características evolutivas, dinámicas y estructurales de apoA-I con el fin de proporcionar una caracterización completa de los fenómenos amiloides en esta proteína, complementando los extensos resultados experimentales disponibles. En conjunto, nuestros resultados sugieren una relación íntima entre la agregación de regiones y la estabilidad estructural en apoA-I. Además, las simulaciones de MD de

mutantes apoA-I de longitud completa arrojan luz sobre los primeros pasos del proceso de agregación en algunos mutantes amiloides.

El hecho de que apoA-I haya conservado segmentos de agregación (APR1 y APR4) consistentemente a lo largo de su historia evolutiva plantea interrogantes sobre su relevancia estructural (Figura 2.2). Se ha propuesto que los motivos amiloides contribuyen a la estabilidad estructural de las proteínas a través de interacciones extensas dentro de los núcleos hidrófobos de proteínas (Langenberg y col. 2020; Tartaglia y Vendruscolo 2010), que establecen un equilibrio entre el entorno de la proteína, la capacidad de plegado y la propensión a la agregación (Linding y col. 2004; Monsellier y col. 2008). Con base en su naturaleza conservada y los resultados de estabilidad de FoldX (Figura 2.5), es posible plantear la hipótesis de que la APR1 es necesaria para asegurar la estabilidad marginal del haz de hélice α de apoA-I, aunque esta región podría desencadenar la agregación tras la exposición al solvente o la escisión proteolítica (Arciello, Piccoli, y Monti 2016). Además, la presencia de una APR2 a pesar de su baja propensión a la agregación, representa un factor de sinergia que podría agravar el comportamiento amiloide de apoA-I, como se demostró recientemente para el péptido N-terminal (Mizuguchi y col. 2019; Yuan Qi Wong y col. 2012). En este contexto, es probable que las características estructurales de la APR1 (baja flexibilidad intrínseca, ambiente altamente empaquetado y varias interacciones de residuos, que se muestran en la Figura 2.3 y 2.4) controlen su exposición al solvente y eviten eventos de agregación. Los experimentos de intercambio de hidrógeno-deuterio (Das y col. 2016) respaldan la naturaleza altamente empaquetada del haz de hélices α y la baja exposición a solventes de la APR1 en apoA-I.

Las variantes amiloidogénicas se encuentran principalmente en la región N-terminal de apoA-I, mientras que las variantes asociadas con deficiencias de HDL se agrupan en la región H5-H7 (Gogonea 2016a; Matsunaga y col. 2010b). A través de una evaluación exhaustiva del efecto desestabilizador y la patogenicidad de cada posible mutación que afecta a la apoA-I, demostramos que las variantes amiloides tienen un efecto desestabilizador significativo sobre la estructura del monómero (Figura 2.8). El hecho de que la tendencia de agregación de TANGO de las APR no se modificó por la introducción de mutaciones amiloides (Tabla 2.1), apoya la hipótesis de que la propensión a la agregación *per se* tiene un impacto limitado en el proceso de agregación de apoA-I de longitud completa y se requieren ciertos factores desestabilizadores para desencadenar la inicio del proceso amiloide (Raimondi y col. 2011). Además, creemos que los valores de $\Delta\Delta G$ derivados de nuestra mutagénesis de saturación *in silico* serán útiles como una primera aproximación para el estudio inicial de nuevos mutantes de apoA-I (Figura 2.5).

Aprovechando el modelo consenso de apoA-I descrito recientemente (Melchior y col. 2017), nuestras simulaciones de MD del mutante G26R (Figura 2.10) revelaron un despliegue parcial del paquete de hélice α N-terminal y un aumento significativo en la exposición de APR1 (Figura 2.8.D), que también es congruente con el efecto desestabilizador predicho a partir de nuestros cálculos de $\Delta\Delta G$. Este despliegue parcial está en línea con los informes experimentales de una mayor susceptibilidad a las proteasas (Adachi y col. 2012) y una mayor tasa de intercambio de hidrógeno-deuterio del paquete de hélice α (Das y col. 2016) para este mutante. Además, las estructuras secundarias de hoja β presentes en la APR4 podrían proporcionar una plantilla para la agregación de apoA-I con la secuencia completa (Das, Mei, Jayaraman, Atkinson, y Gursky 2014). Sin embargo, dada a la flexibilidad estructural de apoA-I, no pudimos obtener estas mismas conclusiones de las otras variantes analizadas.

En conjunto, nuestros resultados obtenidos de la proteína de longitud completa respaldan la hipótesis actual de que el despliegue del haz de hélice y la exposición de las regiones de agregación representan los primeros pasos de la amiloidosis mediada por apoA-I (Mizuguchi y col. 2019). El leve efecto de las variantes L60R, K107del y R173P sobre la estructura de apoA-I y la exposición de APR sugiere que podrían ser necesarias modificaciones adicionales para promover la agregación de estos mutantes, como la oxidación o la escisión proteolítica (Chan y col. 2015b; Witkowski y col. 2018). Además, la presencia del fragmento proteolítico N-terminal (residuos 1-93) dentro de las lesiones de los pacientes plantea la hipótesis de que las mutaciones pueden facilitar la escisión de apoA-I mediante proteasas circulantes (Cavigliolo y Jayaraman 2014; Kareinen y col. 2018). De acuerdo con la aparición tardía de la amiloidosis hereditaria debido a apoA-I en pacientes, se puede plantear la hipótesis de que pueden ser necesarios episodios crónicos leves para inducir el despliegue de proteínas. En base a estas conclusiones surge nuestro particular interés y puntapié para el desarrollo esta tesis: caracterizar profundamente la conexión entre el microambiente proinflamatorio y la formación de especies propensas a la agregación.

Capítulo 3:

El rol de las modificaciones postraduccionales y las variantes naturales en la disfunción de la apolipoproteína A-I humana.

Este capítulo ha sido adaptado de:

“Fibrillar conformation of an apolipoprotein A-I variant involved in amyloidosis and atherosclerosis”. GISONNO y col, BBA, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129515>

“Understanding the role of apolipoproteinA-I in atherosclerosis. Post-translational modifications synergize dysfunction?”. GISONNO, R.*; DIAZ LUDOVICO* y col, BBA, 2020.

* Co-primeros autores.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129732>

3.1 Resumen

La identificación de la apoA-I humana disfuncional en las placas ateroscleróticas sugiere que la estructura y función de las proteínas pueden verse obstaculizadas en un escenario proinflamatorio crónico. Además, el hecho de que algunos mutantes naturales de apoA-I se asocien a enfermedades cardiovasculares (ECV) graves indica que el plegamiento nativo podría cambiar debido a la mutación, dando lugar a una estructura más propensa a plegarse incorrectamente o sufrir pérdida de función. Diferentes conformaciones de proteínas pueden estar involucradas en el desarrollo de manifestaciones clínicas asociadas con la amiloidosis humana. Aunque una conformación fibrilar suele ser la firma del daño en los tejidos de los pacientes, no está claro si esta especie es *per se* la causa o la consecuencia de la enfermedad.

Para comprender los eventos que determinan el fracaso de la flexibilidad estructural de la apoA-I para cumplir su función protectora, se aprovechó en otro enfoque complementario al abordado en el capítulo anterior, el estudio de una variante natural con una delección del residuo lisina 107 (K107del) que constituye un excelente modelo ya que, como se comentó previamente, los pacientes portadores de esta variante presentan amiloidosis y aterosclerosis grave.

Se utilizaron enfoques biofísicos, como electroforesis, fluorescencia, dicroísmo circular y microscopía para caracterizar la estructura y función de las proteínas, ya sea en conformación nativa o bajo oxidación, con el fin analizar la posible contribución de un ambiente pro-inflamatorio. La oxidación controlada indujo una alteración de la conformación del dímero nativo para ambas variantes y obtuvimos un alto rendimiento de estructuras fibrilares estables bien definidas de apoA-I K107del oxidadas.

Concluimos que, aunque las mutaciones pueden alterar la estructura de las proteínas y la disposición espacial, la conformación altamente flexible compensa el leve cambio del plegamiento nativo. Se requieren modificaciones postraduccionales de apoA-I para generar una conformación de proteína con una pérdida significativa de función y una mayor tendencia de agregación. Estos eventos pueden explicar la estrecha asociación entre la amiloidosis debida a apoA-I y la aterosclerosis.

3.2 Introducción

Como hemos mencionado anteriormente, además de su participación en el transporte reverso de colesterol, se ha reconocido la participación crucial de las HDL y apoA-I en las vías que protegen las funciones endoteliales. Las múltiples funciones de apoA-I se han relacionado extensamente con su estructura altamente flexible. La mayor parte de la proteína se encuentra formando parte de las HDL, pero una fracción menor (alrededor del 5-10%) circula libre o con escaso contenido de lípidos, conformaciones que son más efectivas para interactuar con otras proteínas claves (Ouimet, Barrett, y Fisher 2019). Además, una inter conversión dinámica entre distintas conformaciones media su eficacia para interactuar con las membranas y reclutar fosfolípidos y colesterol.

A pesar de la información antes mencionada, la “hipótesis del colesterol HDL” ha sido revisada, ya que parecía estar muy simplificada al establecer un índice de riesgo de aterosclerosis a partir únicamente de la relación LDL/HDL (Ouimet, Barrett, y Fisher 2019; Rader y Tall 2012). Más allá de la utilidad de esta relación como parámetro clínico, la aterosclerosis es un escenario patológico crónico complejo, convirtiéndose en un ambiente prooxidante con la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionadas con el fallo de la homeostasis del colesterol. Curiosamente, las placas ateroscleróticas se caracterizan por apoA-I disfuncional agregada en las paredes arteriales (Y. Huang y col. 2014) y la distribución de proteínas presentes en la aorta humana es bastante diferente de las conformaciones circulantes. Se identifica depositada en lesiones crónicas en grandes cantidades, predominantemente pobres en lípidos, no asociadas con HDL, muy oxidadas y entrecruzadas, y funcionalmente deterioradas (DiDonato y col. 2013). Regiones difusas de la placa son reconocidas además por el colorante Rojo Congo, lo que indica que este microambiente favorece al plegamiento proamiloido. Es relativamente común encontrarlas en personas de avanzada edad y se la considera “amiloidosis senil”. Se desconoce si el plegamiento incorrecto de las proteínas es una causa o una consecuencia de este microambiente. Sin embargo, estos hechos indican que la amiloidosis (asociada a proteína mal plegada) y la aterosclerosis (indicando pérdida de protección en el TRC) pueden estar estrechamente asociadas (Li y col. 2003).

Existen mutantes naturales de apoA-I que están involucrados en la amiloidosis sistémica familiar con diferentes depósitos específicos de tejido (Arciello, Piccoli, and Monti 2016). Se han descrito unas 19 variantes naturales de apoA-I que inducen amiloidosis con depósito y fallo de órganos diana (Gogonea 2016). Es de nuestro particular interés la variante de delección de origen natural (K107del) que induce un patrón patológico único, ya que la amiloidosis generada por esta variante se asoció con

aterosclerosis grave (Amarzguioui y col. 1998). A pesar de que las manifestaciones clínicas que se describen son variables, cabe destacar que muchos pacientes presentan hipo-alfa-colesterolemia con aumento de la tasa catabólica (Tilly-Kiesi y col. 1997) y reducción de la unión de apoA-I a las HDL (Huang y col. 2001a), lo que puede explicar su eliminación más rápida y bajos niveles en la circulación. Además, ésta y otras mutaciones dentro del dominio central están asociadas con hipertrigliceridemia (Gorshkova y col. 2006; Gorshkova, Mei, y Atkinson 2014; Lee y col. 2013) pero no hay informes que describan su agregación amiloide en otros tejidos.

Aprovechando el estudio comparativo estructural entre K107del y la proteína con la secuencia nativa (Wt), nos propusimos comprender las razones que podrían desplazar el perfil antiaterogénico de apoA-I. El conocimiento estructural profundo de esta variante puede ayudar a aclarar la participación de apoA-I en su incumplimiento de los roles protectores. Como los eventos de oxidación están presentes en las placas ateroscleróticas, analizamos la estructura y la función de la variante en condiciones nativas y mediante oxidación controlada, que podría imitar las condiciones que se presentan en un escenario patológico crónico. En este capítulo describimos por primera vez, la mayor tendencia a formar fibras organizadas de la variante K107del en comparación con la proteína Wt. Mediante enfoques biofísicos bien establecidos, caracterizamos las estructuras fibrilares de apoA-I logradas por oxidación.

3. 3. Objetivos

3. 3. 1. Objetivo general

Comprender cómo una modificación postraducciona, como es la oxidación, podría afectar el funcionamiento de la apoA-I y desencadenar su agregación en las placas ateroscleróticas.

3. 2. 1. Objetivos específicos

Comparar estructural y funcionalmente la variante natural K107del con la proteína Wt.

Evaluar cómo la oxidación puede afectar la estructura y funcionalidad de las proteínas en estudio.

Caracterizar las fibras amiloides producidas por oxidación de apoA-I Wt y su variante natural K107del asociada a aterosclerosis.

3. 4. Materiales y métodos

3. 4. 1. Materiales

Clorhidrato de guanidina (GndHCl), tioflavina T (ThT), colesterol (Col), colato de sodio, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cloruro de sodio (NaCl), dodecilsulfato de sodio (SDS), Sigma-Aldrich (St Louis, MO). 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Resina purificadora de His, Novagen (Darmstadt, Alemania). 8-Anilino-2-naftalenosulfonato (ANS) y ácido 4,4'-dianilino-1,1'-binaftil-5,5'-disulfónico, sal dipotásica (Bis-ANS) Invitrogen (Carlsbad, CA). Bis- (sulfosuccinimidil) suberato (BS3) e isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), Thermo Scientific (Waltham, MA). Todos los demás reactivos fueron del más alto grado analítico disponible.

3. 4. 2. Obtención de apoA-I de tipo salvaje (Wt) y K107del recombinantes

3. 4. 2. A Expresión y purificación

La proteína Wt se expresó a partir de un sistema bacteriano *E. coli* BL21, transformado con un ADNc que contiene la secuencia del apoA-I humana modificada para introducir un enlace peptídico Asp-Pro inestable al ácido entre los aminoácidos 2 y 3 (Ramella y col. 2011). Esta construcción se insertó en un plásmido pET-30 (Novagen, Madison, WI) permitiendo su expresión y amplificación. Este vector posee un gen de resistencia a kanamicina y un promotor inducible por IPTG (Ryan et al 2003). La mutación por delección K107del se obtuvo de un plásmido previamente utilizado (Gonzalez y col. 2008a) mediante la introducción adicional del enlace peptídico lábil al ácido (Ramella y col. 2011).

Al inicio de este trabajo de tesis, ambos sistemas se encontraban en correcto funcionamiento y se contaba con controles de secuenciación, expresión y pureza de la proteína obtenida. Los stocks de bacterias se encontraban almacenados con glicerol a -70°C. Para iniciar el crecimiento, las bacterias se estriaron en medio LB-agar (1.5 % agar, 30 μ g/ml kanamicina) y se incubaron toda la noche (ON) a 37 °C, se seleccionó una colonia y se expandió en medio LB con 30 μ g/ml de kanamicina ON a 37 °C con agitación constante. Luego se inocularon 500 ml de medio LB + kanamicina y se crecieron con agitación constante a la misma temperatura. Cuando el cultivo alcanzó una DO de 0.5 a 600 nm se indujo la expresión con IPTG (concentración final 0.4 mM) durante 2 h también con agitación constante a 37°C. Por último, las bacterias se cosecharon por

centrifugación a 7000 rpm durante 10 min. Se confirmó la sobre expresión proteica mediante SDS-PAGE.

Se resuspendió el pellet en una solución de Tris-HCl 20 mM pH 7.4 NaCl 150 mM (buffer A) con 6 M GndHCl y se dejaron en agitación suave a temperatura ambiente durante 4 h a fin de lisar las células. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se dializó ON contra buffer A a 4°C. Previo a la purificación, el extracto proteico se clarificó por centrifugación (10000 rpm 10 min, 4°C).

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad por metales, empleando columnas cargadas con NiSO₄ IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suiza) que retienen con alta afinidad el péptido His-tag. Luego de eluidas las fracciones por competencia con un buffer con Imidazol (50 mM), se chequeó la pureza por SDS-PAGE 16%.

Con el fin de generar la ruptura entre el péptido de fusión y la apoA-I, la fracción que contenía la proteína unida al péptido de fusión His-tag, se incubó con ácido fórmico al 45% a 60°C durante 5 h. Luego, se dializó ON contra el buffer más NaOH, en condiciones equimolares con las unidades de ácido fórmico agregadas previamente. Se realizó una segunda diálisis contra el buffer A durante 4 h. Las muestras se pasaron una segunda vez por la columna de afinidad a fin de separar el péptido de fusión de la proteína. La fracción conteniendo a la proteína pura se dializó contra Tris-HCl 20 mM pH 7.4 ON a 4 °C. Por último, el producto purificado se cuantificó, se fraccionó en alícuotas de ~1 ml y se conservó a -70 °C hasta el momento de ser usado.

Los pesos moleculares (Mw) de las proteínas Wt y K107del fueron calculados por análisis de espectrometría de masas de proteínas intactas. Este análisis se realizó en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, en la Universidad de Buenos Aires/CONICET (Consejo Nacional de Investigación). Las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex II Bruker Daltonics UVMALDI-TOF-TOF. Los espectros se obtuvieron en modo lineal positivo (LP), dentro de un rango de masa de 20000-60000 m/z. Los espectros generados se visualizaron y compararon con el software Flex Analysis 3.3.

3. 4. 2. B Conservación de las proteínas y cuantificación.

Las proteínas se conservaron fraccionadas a -70°C. Previo a cada experimento, y con el fin de asegurar la conformación proteica recientemente plegada, las fracciones fueron disueltas en 2M de GndHCl y dializadas extensivamente frente a Tris-HCl 20 mM pH 7,4.

El contenido de proteína se cuantificó por la técnica Bradford (Bradford 1976), y mediante la medición de la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Bio-Rad (Hercules, CA), usando un coeficiente de extinción de $32430 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm.

3. 4. 3. Oxidación y fibrilación de proteínas

Las proteínas Wt y K107del se oxidaron químicamente mediante incubación en un exceso con H_2O_2 a 37°C durante 12 h, en una relación molar peróxido:proteína de 10000:1. La concentración de H_2O_2 se determinó espectrofotométricamente (ϵ $39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 240 nm) (Krishnamoorthy y col. 2018). El exceso de H_2O_2 se eliminó mediante diálisis extensa contra buffer fosfato de sodio 10 mM pH 6,0 (buffer de fibrilación).

La pureza de las muestras de proteínas, tanto frescas como oxidadas, se controlaron mediante SDS PAGE 16%. Además, la oligomerización de las variantes se verificó mediante PAGE nativo en gradiente nativo 4-25%.

Los pesos moleculares (M_w) de las proteínas oxidadas Wt y K107del se calcularon mediante análisis de espectrometría de masas de proteínas intactas. Este análisis se realizó en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, utilizando el equipamiento y metodología descrito arriba.

Con el objetivo de lograr estructuras fibrilares, las variantes de apoA-I, ya sean frescas u oxidadas, se incubaron a $28 \mu\text{M}$ en el buffer de fibrilación, en condiciones estériles durante 30 días, con agitación en un termomezclador termostatzado (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 37°C , 500 rpm.

3. 4. 4. Entrecruzamiento químico de proteínas.

Para llevar a cabo los ensayos utilizamos bis-sulfosuccinimidil suberato (BS3), un éster de NHS soluble en agua ampliamente utilizado en ensayos de entrecruzamientos o reticulación de apoA-I. Reacciona eficazmente con grupos amino primarios ($-\text{NH}_2$) en buffers de pH 7 a 9 para formar enlaces amida estables.

La presencia de la conformación monomérica después de los tratamientos de oxidación se confirmó mediante electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para evaluar si la oxidación de proteínas puede inducir una conformación propensa a la agregación, las proteínas se incubaron durante 24 h a $0,6 \text{ mg/ml}$ y se entrecruzaron con BS3. Se añadió el entrecruzante fresco (dentro de 1 minuto después de la solubilización en PBS para evitar su hidrólisis) a una relación molar de BS3: proteína de 30: 1 (Mcguire y Davidson 1996). Las reacciones se interrumpieron a los 15 min mediante la adición de buffer Tris hasta una concentración final de 50 mM.

3. 4. 5 Metodologías de interacción proteína/lípidos

Con el objetivo de estudiar la interacción de las proteínas de interés con lípidos, utilizamos liposomas. 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 clearance en inglés).

3. 4. 5. A Ensayo de aclaramiento de Di Miristoil Fosfatidil Colina (DMPC)

Para obtener vesículas multilaminares (MLV) de DMPC, los lípidos de una solución madre en cloroformo se secaron bajo flujo de N₂ y se resuspendieron en buffer Tris pH 7,4 hasta una concentración final de DMPC de 5 mg/ml. El tubo se agitó con vórtex a temperatura ambiente durante 5 min, calentando a 37 °C en ciclos de 30 segundos hasta obtener una emulsión homogénea (Prieto y col. 2012). Se añadieron vesículas de DMPC a las muestras de proteínas de 0,05 mg/ml hasta una relación molar final de 145:1 de DMPC: proteína. Las muestras se mezclaron suavemente (durante 5 segundos) y el aclaramiento se determinó registrando la DO a 325 nm y 24°C (temperatura de transición de dicho fosfolípido) en un lector de microplacas Beckman Coulter DTX 880 (Beckman, CA). Todos los experimentos se realizaron en presencia de azida de sodio a una concentración final del 0,05%. Las curvas se ajustaron a la siguiente disminución exponencial $y = y_0 + ae^{-bx}$.

3. 4. 6. Caracterización de la estructura proteica de las proteínas oxidadas.

3. 4. 6. A. Caracterización estructural de las proteínas recién plegadas por fluorescencia.

Las estructuras de las proteínas, tanto frescas como oxidadas, se analizaron mediante técnicas de fluorescencia bien reconocidas. La emisión del triptófano (Trp) es altamente sensible al ambiente que lo rodea, sufriendo un corrimiento hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo del espectro), cuando más polar es el medio al que se expone. A fin de comparar cambios estructurales de las variantes de apoA-I, ya sea por la mutación o la PTM, definimos excitar las muestras a una longitud de onda de 295 nm con el fin de estudiar casi exclusivamente el entorno de los residuos Trp (Ramella y col. 2011; Rosú y col. 2015). La estructura primaria de la apoA-I posee 4 residuos Trp en las posiciones 8, 50, 72 y 108. Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del Trp se adquirieron en un espectrofluorómetro SLM4800 actualizado por Olis (ISS Inc,

Champaign, IL). Las proteínas, recién resuspendidas o después de modificaciones químicas, se diluyeron a 3.6 μM .

A fin de caracterizar la organización estructural de las especies proteicas recién plegadas (Wt y K107del nativas u oxidadas), se evaluó la fluorescencia de la sonda extrínseca ANS, dada su posibilidad de experimentar corrimientos sensibles del espectro de emisión en base al entorno en el que está solubilizado. Para ello 3.6 μM de proteínas se incubaron con ANS a una relación molar de sonda a proteína de 20:1 en buffer de fibrilación. La excitación se ajustó a 380 nm y los espectros de emisión se escanearon de 400 a 600 nm. Asimismo, se añadió Bis-ANS en una relación molar de 3:1 a las proteínas, y los espectros se detectaron con excitación a 395 nm y se escanearon las emisiones entre 440 y 540 nm.

Además, para caracterizar la estructura secundaria, se registraron espectros de dicroísmo circular (CD) en la región ultravioleta lejana (UV) (200–250 nm) en un espectropolarímetro Jasco J-810 (ver anexo de fundamentos de técnicas empleadas). Los espectros de las muestras se recogieron utilizando una cubeta de 1 mm de longitud de paso de luz, a una velocidad de escaneo de 20 nm min^{-1} con una constante de tiempo de 1 s. Cada espectro se midió al menos tres veces y los datos se promediaron para minimizar el ruido. La elipticidad molar se calculó utilizando un valor medio del peso del residuo de 115.5 y 115.4 para las proteínas Wt y K107del, respectivamente (Schmid 1989). Los espectros mostrados son representativos de tres experimentos separados diferentes. El porcentaje de estructura secundaria de proteínas se calculó a partir de la elipticidad a 222 nm mediante la expresión empírica de Chen y col. (Chen y col. 1972).

3. 4. 6. B. Cinética de formación de estructuras tipo amiloide seguida de tioflavina (ThT).

Para detectar la formación de agregados de proteínas, el tamaño relativo de las muestras incubadas se estimó durante 10 y 30 días mediante detección de absorbancia a través de un filtro centrado a 340 nm en el lector de microplacas. Cada muestra se diluyó a 5 μM en buffer Tris 20 mM pH 7.4, y se añadió ThT a una relación molar de 2:1 sonda:proteína. La fluorescencia se registró con filtros de excitación y emisión establecidos a 430 nm y 490 nm respectivamente en el lector de microplacas.

3. 4. 6. C. Morfología de agregados de la variante ApoA-I

La formación de agregados proteicos se controló mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para realizar TEM, las proteínas se cargaron en rejillas de cobre recubiertas de carbono durante 5 min, se eliminó el exceso y se añadió

una gota de ácido fosfotúngstico al 0.2% durante 30 segundos y el exceso se secó. Estas muestras se observaron en un microscopio electrónico Jasco a 100 kV.

Además, las muestras fueron analizadas por microscopía de fuerza atómica (AFM). En este caso, se observaron variantes de proteínas (28 μM) depositadas sobre grillas de mica recién cortadas. Las muestras se lavaron con agua pura para eliminar el exceso de proteínas y sales no unidas y se secaron bajo N_2 . Todas las imágenes se obtuvieron en condiciones ambientales usando un Multimode-Nanoscope V (Veeco, Santa Barbara, CA) en modo de contacto intermitente (tapping). La sonda utilizada fue Nano Word dotada con Nitruro de Silicio, cuyas características fueron: frecuencia de resonancia del cantiléver 258 kHz, constante de fuerza de 42 N/m; radio nominal de la punta 5-10 nm. La velocidad de barrido fue de 1-1,5 Hz.

3. 4. 7. Otros métodos analíticos

Para la mayoría de los experimentos, la concentración de proteínas se cuantificó mediante la técnica de Bradford (Bradford 1976). Para el análisis estadístico, los conjuntos de datos se analizaron en el software GraphPad Prism 8.0 utilizando una prueba paramétrica no apareada. Solo se consideraron los resultados con un nivel de confianza de $p < 0,05$. A menos que se indique lo contrario, los resultados de los ensayos se reprodujeron en tres experimentos independientes y se indicaron como media de triplicados \pm desviación estándar. Otras diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante ANOVA.

3. 5 Resultados

3. 5. 1. Expresión y purificación de proteínas

Las variantes de apoA-I, ya sea Wt o K107del, se aislaron y purificaron con alto rendimiento y pureza a partir de cepas bacterianas. En la Figura 1.1. se observa la pureza alcanzada, superior al 95%, cuantificada por densitometría utilizando ImageJ, luego del SDS-PAGE 16% teñido con Coomassie Blue. Anteriormente, se había demostrado que la proteína Wt purificada bajo este protocolo se comporta de manera indistinguible a la apoA-I plasmática (Prieto y col. 2012).

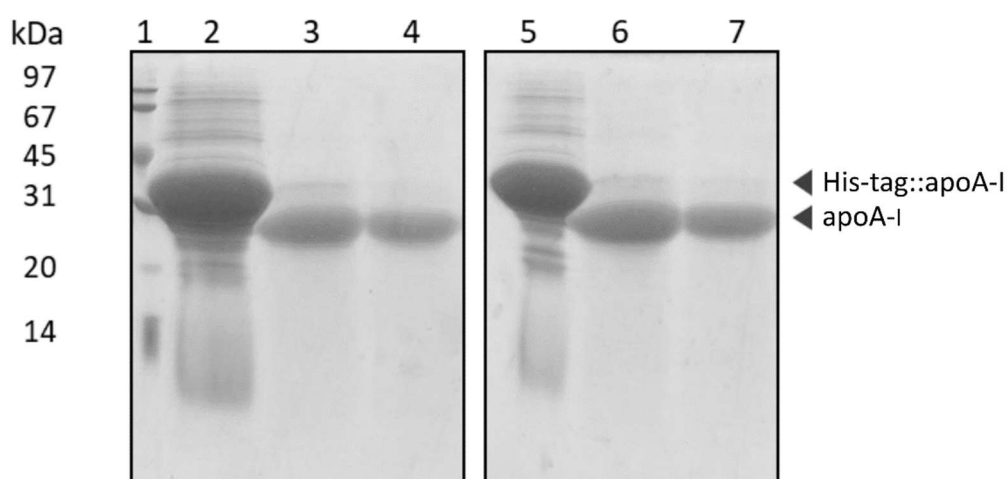


Figura 3.1. Caracterización de la pureza de las proteínas. K107del (izquierda) y Wt (derecha) se purificaron mediante columnas de afinidad IMAC Sepharose y se corrieron en SDS-PAGE al 16% teñido con Coomassie Blue. Calle 1: Estándar de bajo peso molecular comercial (GE Healthcare). Calles 2 y 5: proteína fusionada a His. Calles 3 y 6: fracciones puras finales luego de la remoción del His tag a 0,9 mg / ml. Calles 4 y 7 fracciones puras finales luego de la remoción del His tag a 0,5 mg / ml.

Los pesos moleculares (Mw) de las proteínas Wt y K107del fueron calculados por análisis de espectrometría de masas de proteínas intactas. El Mw de apoA-I Wt se predijo usando el software Protein Prospector. Los Mw pronosticados y calculados fueron 27.781 Da y 27.786 Da para Wt, respectivamente. Para la variante K107del, el Mw calculado fue de 27.651 Da, coincidiendo con una disminución de masa equivalente a una lisina.

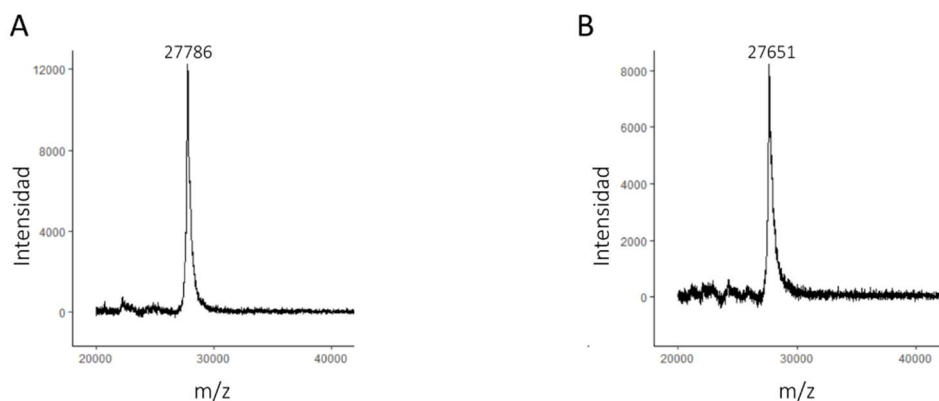


Figura 3.2. Análisis de espectrometría de masas de proteína intacta de Wt (A) y K107del (B). Los pesos moleculares están en amplia concordancia con los valores esperados.

3. 5. 2. Caracterización de las proteínas oxidadas.

3. 5. 2. 1. Influencia de la oxidación en la estructura de las variantes nativas solubles.

Las muestras de proteínas, tanto frescas como oxidadas, mostraron un alto grado de pureza (Figura 3.3.A). Además, la oligomerización de las variantes se verificó mediante PAGE de gradiente nativo (Figura 3.3.B). Como se esperaba, se observó un grado leve de oligomerización en las proteínas oxidadas (Chan y col. 2015).

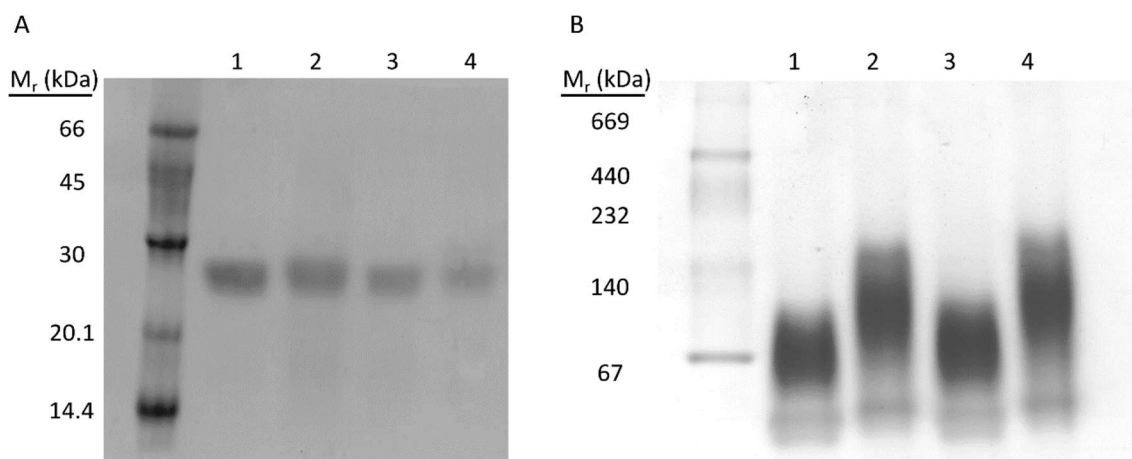


Figura 3.3. Control de la pureza y oligomerización de las proteínas post-oxidación.

A: Caracterización de la purificación de proteínas por SDS-PAGE al 16% teñido con Coomassie. La calle a la izquierda representa el estándar comercial de bajo peso molecular para SDS (Amersham Biosciences, Reino Unido). Calles 1 a 4: Wt, oxWt, K107del y oxK107del respectivamente. B: PAGE en gradiente nativo del 4-25% para verificar la calidad de la proteína y el estado oligomérico. La

calle a la izquierda representa el estándar comercial de alto peso molecular (Amersham Biosciences, Reino Unido). Wt y oxWt (calles 1 y 2). K107del y oxK107del (calles 3 y 4 respectivamente).

Con el fin de evaluar la oxidación de K107del comparativamente con Wt, medimos la masa intacta de las variantes de apoA-I oxidadas mediante espectrometría de masas (Figura 3.4). El Mw obtenido para oxWt (Figura 4A, 27.857 Da) o oxK107del (Figura 3.4.B, 27.727 Da) fue cada uno 71-76 Da mayor que los valores obtenidos para las variantes nativas. Teniendo en cuenta que los aductos de sodio pueden agregar este cambio en el peso molecular y el error del método, los resultados son compatibles con la oxidación completa de todos los residuos de metionina, ya descrita para apoA-I (Chan y col. 2015a; Wong y col. 2010). Una ganancia similar de masa global aproximada sugeriría que ambas proteínas están experimentando procesos oxidativos equivalentes, para confirmarlo serían necesarios análisis de espectrometría de masa de los péptidos luego de la digestión de apoA-I con proteasas.

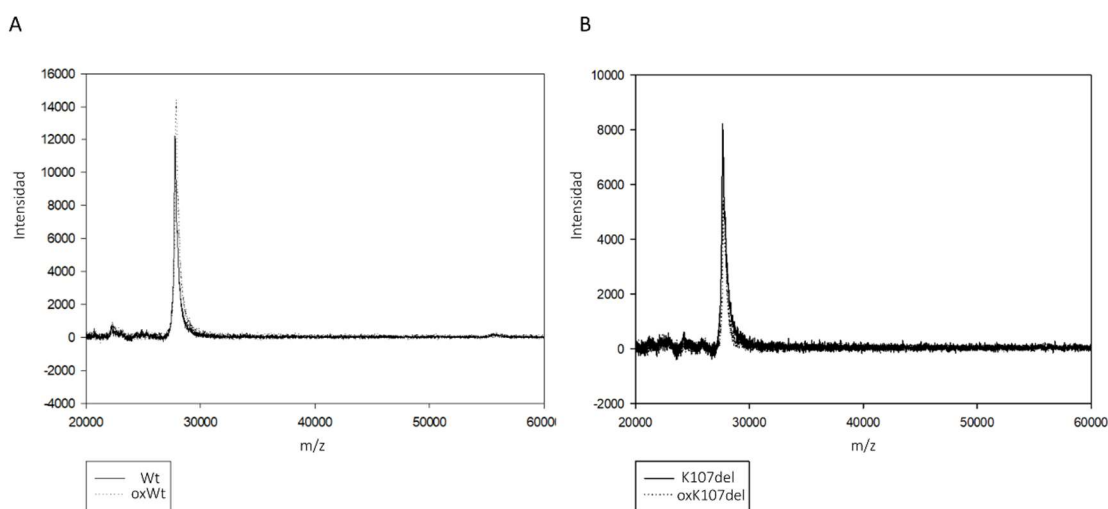


Figura 3.4. Efecto de la oxidación sobre el peso molecular de la proteína. Espectros de MS de A) Wt y oxWt y B) K107del y oxK107del.

El entrecruzante BS3 se ha utilizado ampliamente para el análisis de la estructura de apoA-I (Mcguire y Davidson 1996). Su brazo espaciador corto (~ 11 Å) lo hace adecuado para fijar covalentemente grupos amina primaria dentro de proteínas. Además del grupo amina N terminal, la apoA-I contiene un elevado número de residuos de Lys que pueden exponerse para interactuar con el reactivo en un disolvente acuoso. El tratamiento de apo Wt y la variante de delección con este agente resultó en un menor

rendimiento del dímero en el mutante en condiciones nativas (Figura 3.5, calle 1 vs calle 4). Para comparar si las proteínas oxidadas podían mantener la capacidad de autoasociarse, se incubaron variantes (no oxidadas o después de la incubación con H₂O₂) a 0.6 mg/ml durante 24h pH 6; luego se llevó el pH a 7.9 y se trató posteriormente con BS3 como se describió anteriormente. Como se puede observar en la Figura 3.5, la banda correspondiente al dímero se desvanece para las especies oxidadas (calles 2 y 3).

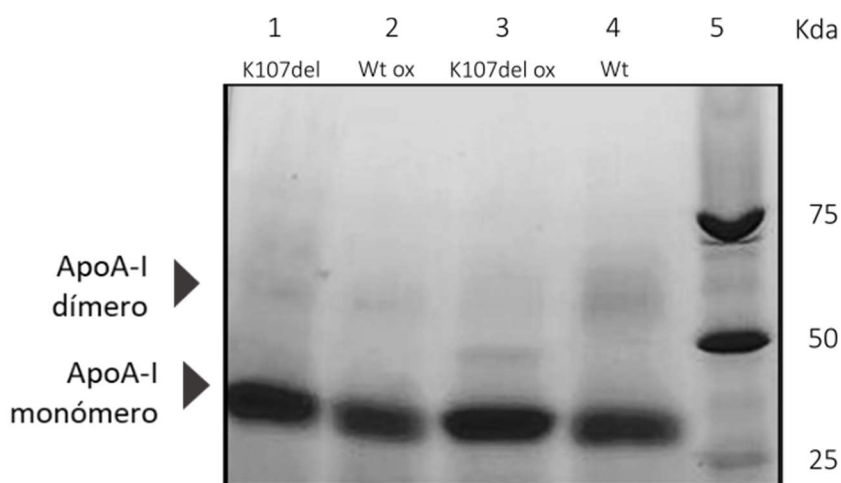


Figura 3.5. Caracterización del efecto de la oxidación en la conformación dimérica.

SDS-Gel de electroforesis de poliacrilamida en gradiente (PAGGE) (4-16%) para comparar el efecto de la oxidación sobre la eficiencia de dimerización de apoA-I. Calle 1 y 4 K107del y Wt tratados con BS3 respectivamente. Las calles 2 y 3 corresponden a Wt y K107del oxidada tratadas con BS3. Calle 5: marcador estándar de Mw.

El análisis de la exposición relativa de los residuos de Trp al disolvente puede usarse como control conformacional de proteínas. La alta flexibilidad de apoA-I puede evaluarse por el cambio en la fluorescencia intrínseca, al fijar la longitud de onda de excitación a 295 nm, la fluorescencia está dominada en promedio por cuatro residuos de Trp de la secuencia nativa de apoA-I (Ramella y col. 2012; Rosú y col. 2015). De acuerdo con los resultados reportados previamente, (Ponsin y col. 1985; Ramella y col. 2012) la longitud de onda de máxima fluorescencia de Trp (WMF) en la variante K107del recién plegada mostró un pequeño pero significativo cambio de 2 nm al rojo con respecto a Wt.

El tratamiento controlado con H₂O₂ resultó en la preservación de principalmente la integridad del peso molecular de la proteína (Figura 3.3). Para caracterizar con mayor detalle si los residuos aromáticos podrían verse afectados durante la oxidación de H₂O₂, verificamos la fluorescencia intrínseca de las variantes oxidadas. Aproximadamente 4

nm de cambio al rojo del WMF y una pequeña disminución en la intensidad indicó que los residuos aromáticos están relativamente más expuestos en ambas variantes, pero significativamente conservados, ya que una oxidación extensa debería resultar en una disminución significativa en el rendimiento cuántico (Figura 3.6).

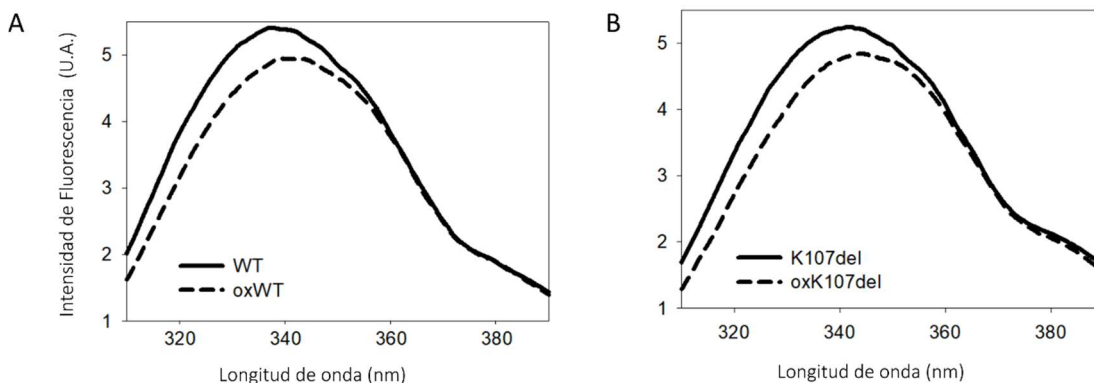


Figura 3.6. Espectros de fluorescencia intrínseca de variantes de apoA-I. Modificación química postraducciona. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro SLM 4800 fijando la longitud de onda de excitación a 295 nm y controlando la emisión de 310 a 400 nm. Los espectros se normalizaron a la intensidad más alta para comparar mejor el cambio en la emisión de fluorescencia. A) Wt y B) K107del fluorescencia intrínseca registrada antes (líneas continuas) o después del tratamiento oxidativo (líneas discontinuas).

Las características estructurales de apoA-I K107del recién plegada respecto a Wt han sido descritas previamente por nuestro y otros grupos (Gorshkova y col. 2014; Ramella y col. 2012). Las sondas externas ANS y su dímero Bis-ANS se han utilizado ampliamente para obtener información sobre la exposición relativa de los parches hidrofóbicos, que es máxima en proteínas flexibles como apoA-I (Lakowicz 2006). Como se observó antes (Gorshkova y col. 2014), la unión de ANS a apoA-I Wt da como resultado un desplazamiento hacia el azul de ~40 nm y un aumento de ~3.5 veces la intensidad de fluorescencia en comparación con su emisión en el buffer solo (Figura 3.7.A). La unión de la sonda a K107del resultó, como se esperaba, en un desplazamiento al azul (5 nm más desplazado que la proteína Wt) y un aumento en el rendimiento cuántico con respecto a Wt (Gorshkova y col. 2014).

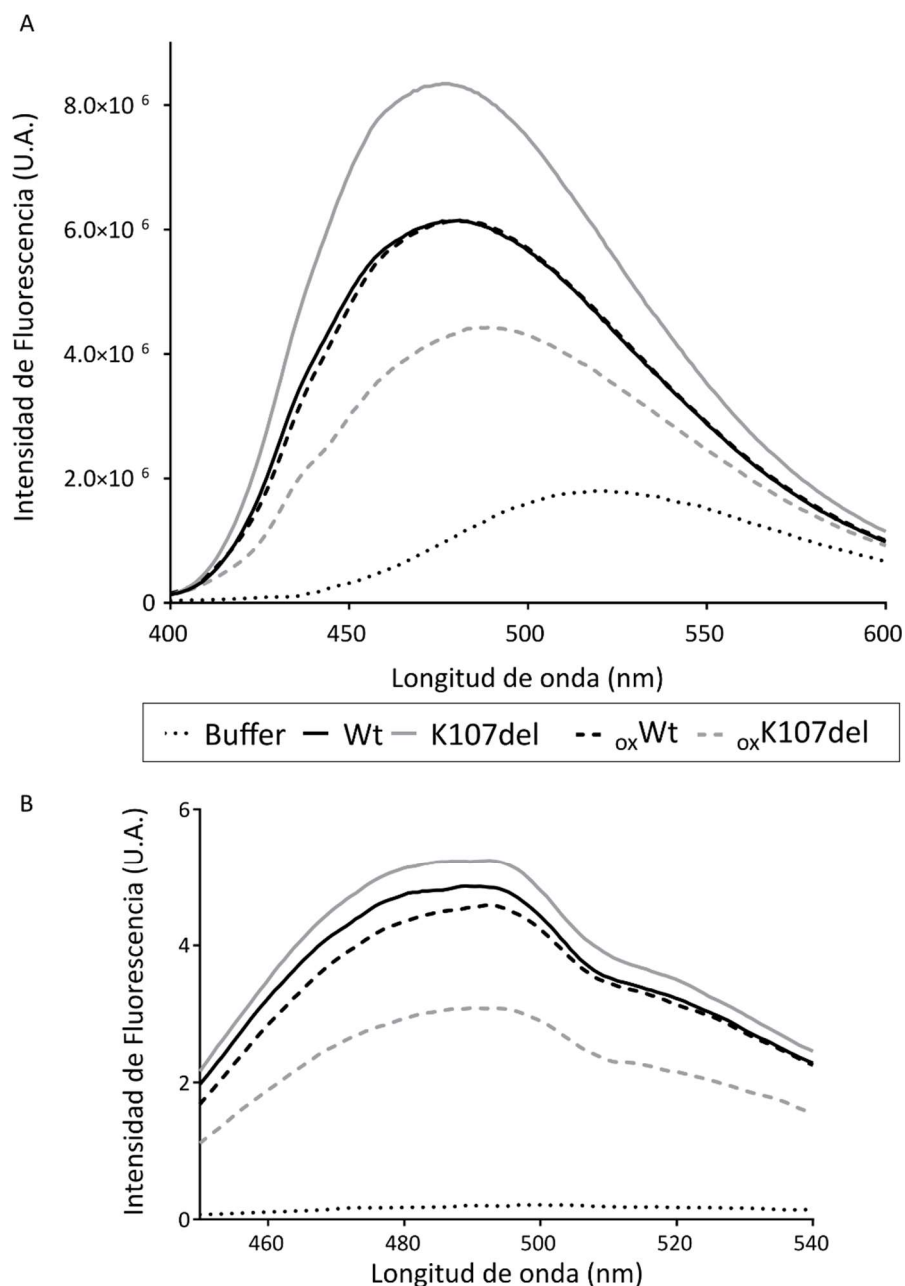


Figura 3.7. Caracterización de la conformación de variantes de apoA-I soluble oxidada. Las proteínas (variantes recién plegadas u oxidadas) se diluyeron a $3,6 \mu\text{M}$ y los espectros de las sondas fluorescentes extrínsecas se registraron en un espectrofluorómetro SLM 4800 actualizado por Olis. A) Se añadió ANS en una relación molar sonda a proteína de 20: 1. La excitación se ajustó a 380 nm y los espectros de emisión se escanearon de 400 a 600 nm. B) Se añadió Bis-ANS y los espectros se detectaron con excitación a 395 nm y se escanearon las emisiones entre 440 y 540 nm. Las mediciones se realizaron en tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas. Las líneas grises continuas, negras continuas, negras discontinuas y grises discontinuas corresponden a Wt, K107del, oxWt y oxK107del respectivamente. La línea gris punteada corresponde a sondas disueltas en buffer en ausencia de proteínas.

Si bien se detectó una diferencia de fluorescencia no significativa entre Wt recién resuspendido y oxidado, la unión de ANS a oxK107del resultó en una disminución de la intensidad de fluorescencia. Además, se observó un cambio al rojo en relación con la proteína no oxidada para el oxK107del (Figura 3.7.A). En una tendencia similar, se detectó un leve aumento en la fluorescencia de Bis-ANS cuando la sonda se une a K107del con respecto a Wt, y una pérdida de fluorescencia significativa a medida que ambas proteínas se oxidaron (Figura 3.7.B).

El análisis de la estructura secundaria se evaluó mediante CD en el UV lejano. Los espectros mostrados en la Figura 3.8 revelaron un alto contenido de estructura α helicoidal para Wt (63%) y un menor contenido de estructura secundaria de α hélice para K107del nativo (~12%). Se determinó el mismo valor (~12%) para ambas proteínas oxidadas.

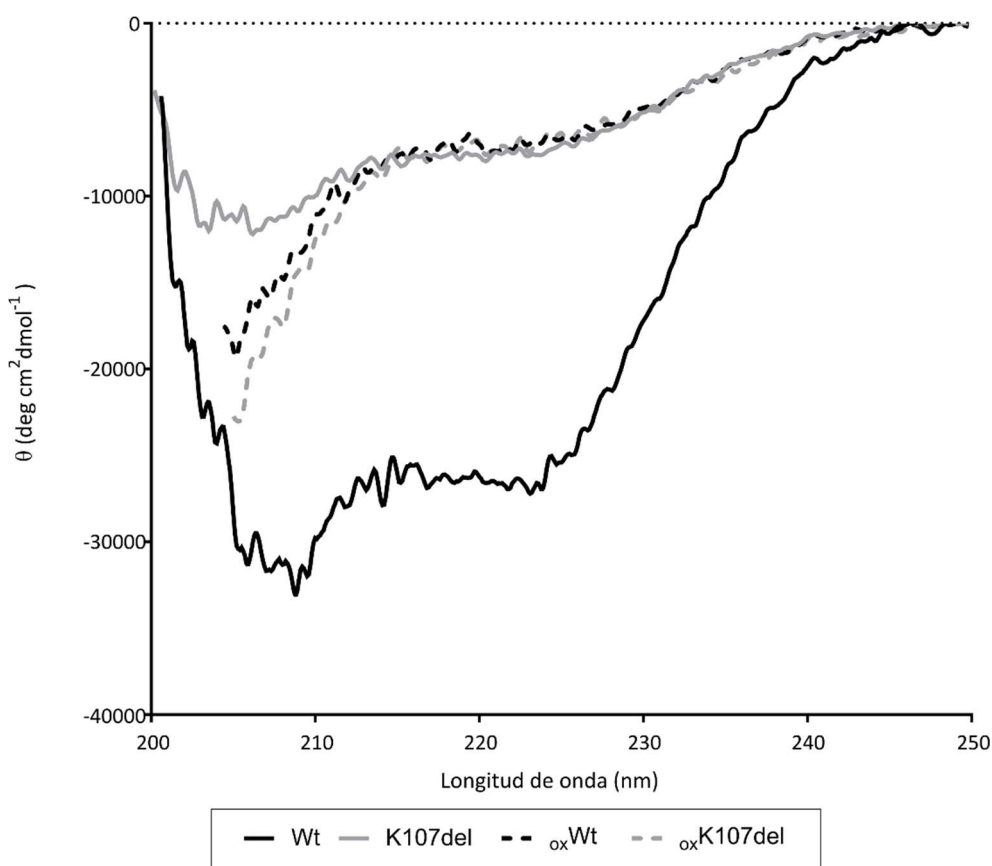
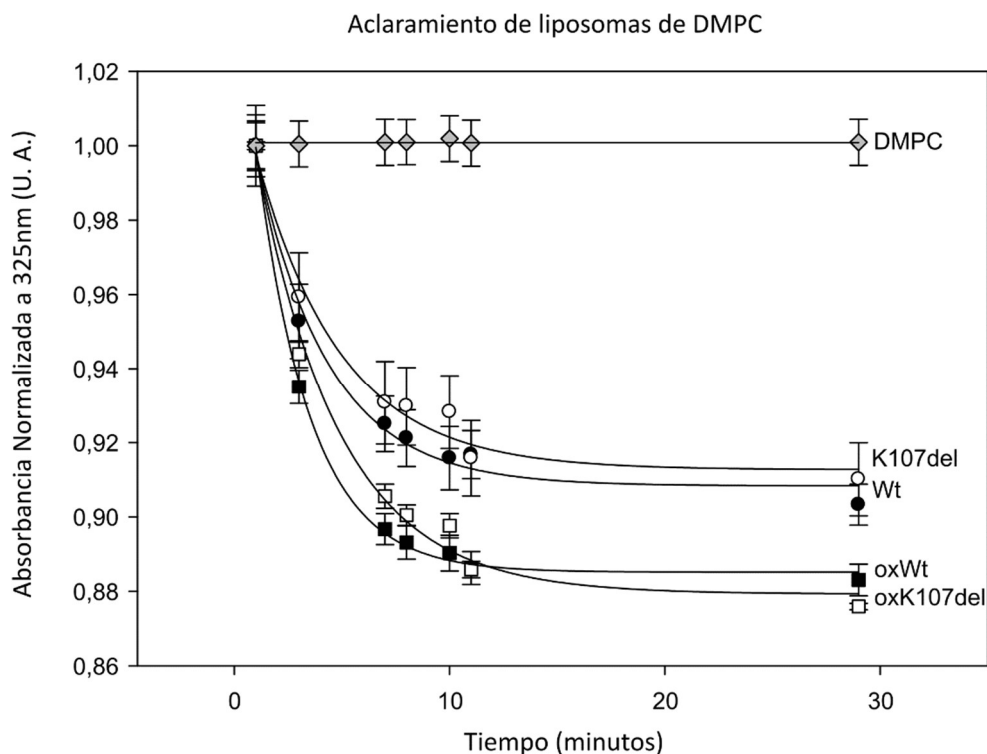


Figura 3.8. Contenido de la estructura secundaria. Los espectros de CD en la región UV lejana se recogieron con proteínas diluidas a 7 μ M en buffer de fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0. El gris continuo, el negro continuo, el negro discontinuo y las líneas grises discontinuas corresponden a Wt, K07del, oxWt y oxK107del respectivamente.

Desafortunadamente, la relación señal/ruido en nuestro sistema no nos permitió determinar los espectros a longitudes de onda más bajas. Sin embargo, una simple inspección visual de los espectros revela un cambio en su forma. La aparición de un mínimo de intensidad hacia las longitudes de onda más bajas medidas, podría indicar un aumento en la estructura desordenada a medida que las proteínas se oxidan.

3. 5. 2. 3. Efecto de la modificación química sobre la función de las proteínas

Con el objetivo de responder si las modificaciones químicas pueden afectar la función de las proteínas, realizamos una prueba ampliamente validada para caracterizar las apolipoproteínas, como es la capacidad de solubilizar los lípidos de las vesículas a su temperatura de transición (Rosú y col. 2015). La eficiencia de solubilización se evalúa mediante la disminución de dispersión de luz cuando la remoción de lípidos mediada por la proteína resulta en una disminución en la concentración de liposomas multilamelares. Como se esperaba, la adición de apoA-I Wt a los liposomas resulta en un aclaramiento rápido y eficiente (Figura 3.9, círculos negros). La delección de K107 no modificó la eficiencia de la proteína en esta función. La oxidación controlada de las proteínas no parece inducir diferencias significativas para solubilizar lípidos entre la oxWt y la oxK107del. Sin embargo, este tratamiento indujo una mayor capacidad para aclarar los liposomas de MLV con respecto a las conformaciones de proteínas nativas.



Diferencias significativas en la absorbancia de punto final				
Protein	Wt	K107del	oxWt	oxK107del
Wt		No	Yes	Yes
K107del			Yes	Yes
oxWt				No
oxK107del				

Figura 3.9. Transcurso del tiempo de la interacción de variantes nativas, entrecruzadas u oxidadas con liposomas DMPC. A) Se agregaron vesículas de DMPC multilaminares a variantes de apoA-I a 0.05 mg / ml, a una relación molar final de fosfolípido a proteína 145: 1 a 24°C. La eficacia de la solubilización de lípidos se midió siguiendo la absorbancia a 325 nm. Las líneas continuas corresponden al ajuste de las curvas a un decaimiento exponencial simple. B) La diferencia entre la absorbancia de la muestra en el último tiempo de incubación (30 min) se estimó mediante la prueba t ($p \leq 0.05$)

3. 5. 3. Conformación fibrilar de las proteínas en estudio

Para seguir la cinética de la agregación, las proteínas nativas y oxidadas se incubaron a 37°C en buffer de fibrilación bajo agitación durante 30 días. La medición de la absorbancia, que es proporcional al tamaño de los agregados de proteínas, apoyó la formación de complejos de mayor tamaño para oxK107del (Figura 3.10A). Esta tendencia es evidente a los 10 días y se incrementa al final del periodo testeado. La detección de fluorescencia asociada a ThT es una herramienta ampliamente utilizada, ya que es sensible a la formación de especies amiloides. En completa concordancia con lo observado por absorbancia, solo oxK107del mostró un aumento significativo de la fluorescencia ThT después de 10 días (Figura 3.10.B).

Los datos comparativos de CD en el UV lejano (Figura 3.10.C) revelaron que no había una diferencia importante entre oxK107del fresco e incubado (línea punteada gris y verde continua, respectivamente). Para evaluar el rendimiento en la formación de estructuras fibrilares, la muestra incubada se centrifugó durante 10 min a 16100xg y el sedimento obtenido se solubilizó en el mismo volumen con buffer. El sedimento (pellet) de oxK107del mostró una señal baja pero más fuerte que la obtenida para Wt (señal casi nula, no se muestra). Este hecho indica que la mayor parte de la proteína se mantuvo soluble. Las especies propensas a la agregación interfieren con la señal a longitudes de onda inferiores a 200 nm, lo que no permite la adquisición de información a longitudes de onda más cortas.

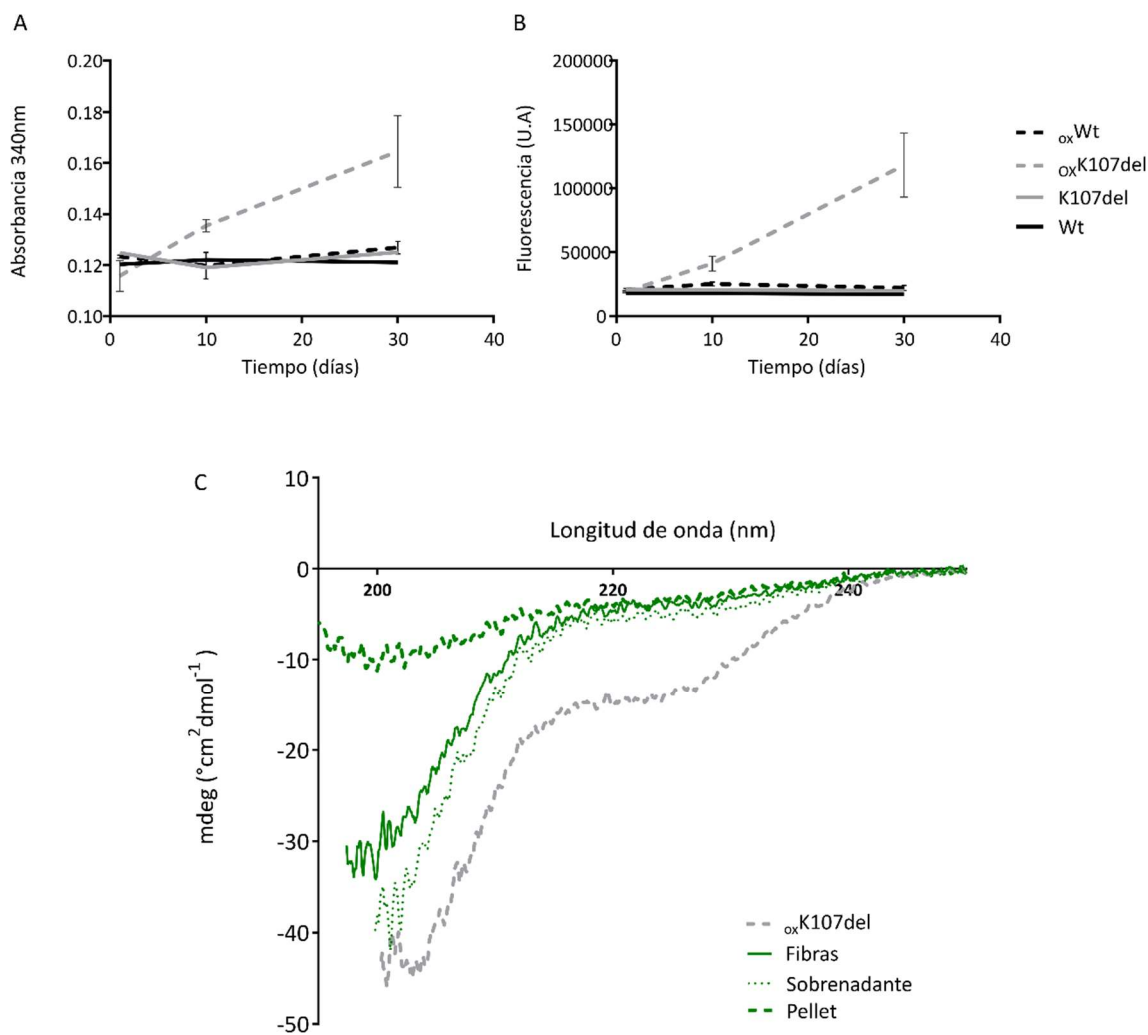
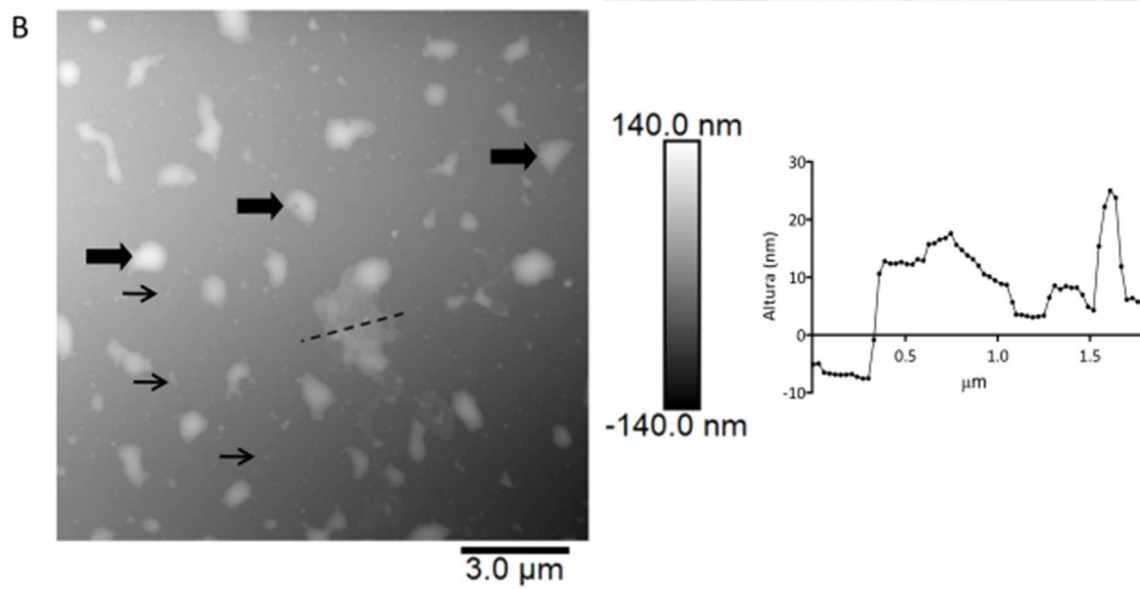
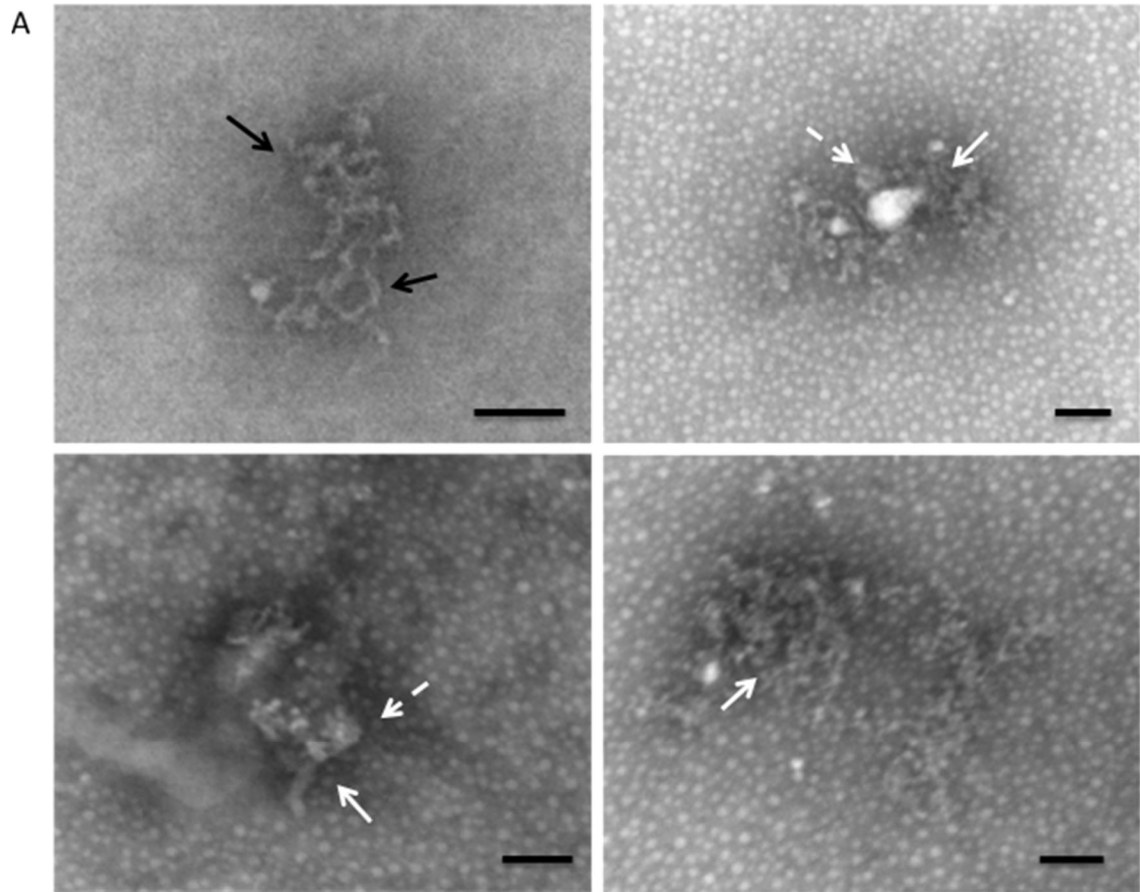


Figura 3.10. Tendencia de agregación de las variantes de apoA-I. La tendencia de agregación del curso temporal de Wt, K107del, y las formas oxidadas se monitorearon mediante diferentes técnicas. Las proteínas a 28 μM en buffer de fibrilación se incubaron bajo agitación durante 30 días a 37 ° C. A) Se detectó la absorbancia a través de un filtro de 340 nm en un lector de microplacas. B) Las proteínas se diluyeron a 5 μM en Tris Buffer y se añadió ThT en una relación molar de sonda 2: 1 a proteína. La fluorescencia se registró con filtros de excitación y emisión centrados a 430 nm y 490 nm, respectivamente. Los símbolos de línea son los mismos que en las Figuras 3.8. Las barras corresponden a la media \pm DE de tres muestras (Figura 3.10.A y B). C) Espectros de CD de UV lejano de oxK107del recién resuspendidas (línea gris discontinua) e incubados 30 días como en A) (línea verde continua). La proteína incubada se centrifugó adicionalmente a 16100 $\times\text{g}$ durante 10 min; el sobrenadante se separó y se midió (línea verde punteada), el sedimento se resuspendió en el mismo volumen y se midió según lo establecido (línea verde discontinua). Las mediciones se realizaron en tres experimentos independientes, con tres réplicas técnicas.

Para confirmar la presencia y estructura de los agregados luego de este plazo de incubación, se observaron muestras oxidadas usando TEM y AFM (Figura 3.11). Hemos demostrado previamente que la incubación a corto plazo de Wt a baja concentración y a pH 7,4 resultó en la formación de estructuras de tipo oligómero (Ramella y col. 2012). Bajo la condición utilizada aquí, las imágenes TEM de oxWt(f) (f, fibrilar o incubado 30 días) mostraron altas cantidades de oligómeros (flechas blancas discontinuas), protofibras (flechas blancas continuas) y fibras (flechas negras continuas) dispersas en el campo, con un diámetro promedio de alrededor de 2-10 nm (Figura 3.11.A). Estas estructuras están de acuerdo con las observadas por Chan y colegas en condiciones similares (Chan y col. 2015). Para obtener una mejor caracterización estructural de esta conformación de proteínas, también observamos los agregados de proteínas por AFM, lo que permite el análisis de la altura promedio de las muestras bajo observación y la asociación de esta altura con el diámetro de la fibra o agregado (Figura 3.11.B) Además de las protofibras, la muestra contenía estructuras oligoméricas de aproximadamente 5–20 nm de altura, indicadas con flechas delgadas en la Figura 11.B. Se observaron asimismo conformaciones de mayor altura dispersas en la mica, como las indicadas en la figura por la línea discontinua, e incluso agregados más altos, como las indicadas por flechas negras gruesas.

De manera interesante, las imágenes de TEM de oxK107del estaban representadas principalmente por fibras, de aproximadamente 8–15 nm de diámetro con una morfología bien definida (Figura 3.11.C). En concordancia con esta observación, la microscopía AFM mostró un mayor rendimiento de fibras (Figura 3.11.D) con una altura homogénea (20-40 nm). La mayor definición de esta técnica nos permitió observar mejor la estructura con fibras retorcidas (recuadro Figura 3.11.D).



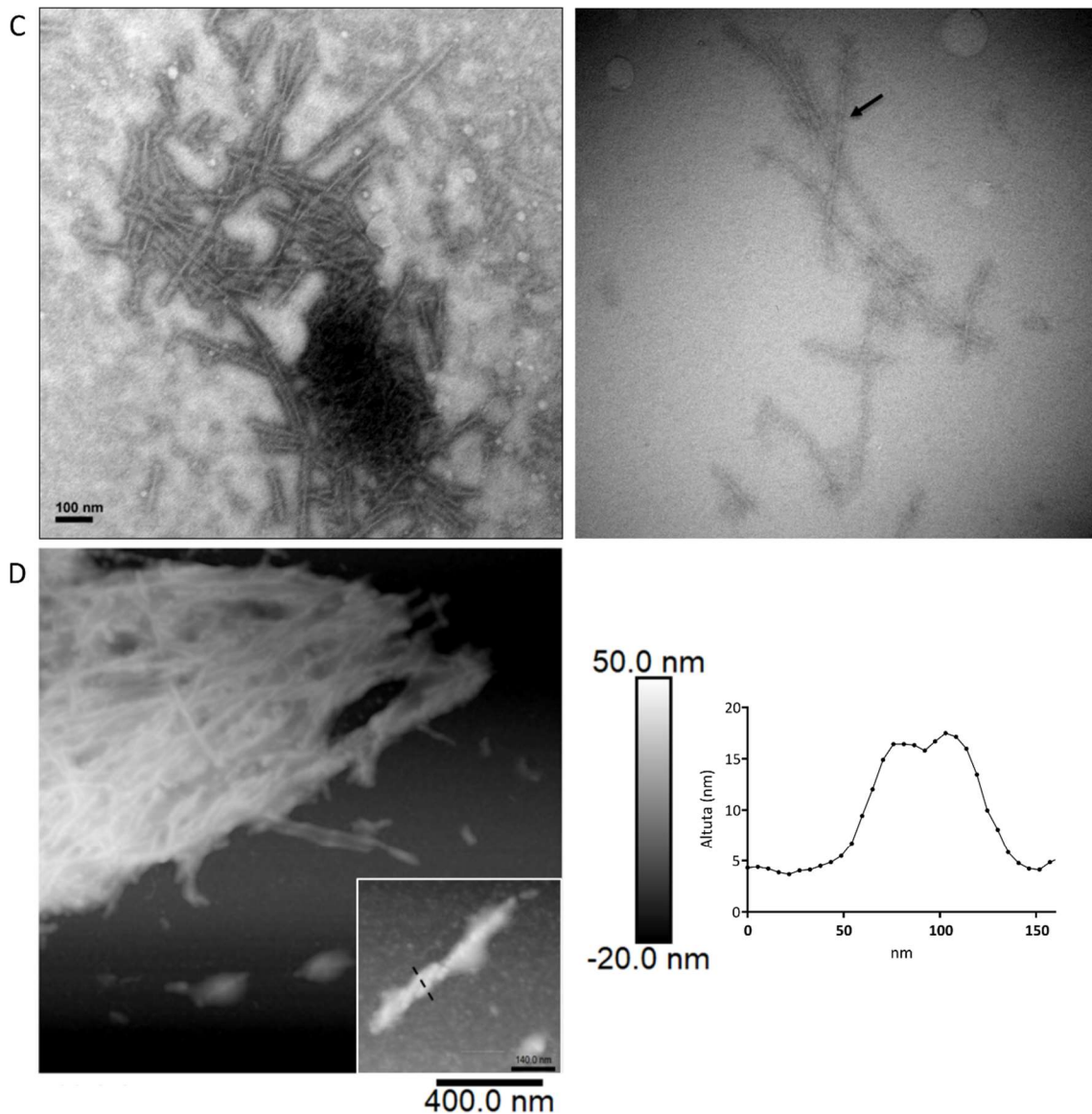


Figura 3.11. Caracterización morfológica de los agregados oxidados de apoA-I. Después de 30 días de incubación en el buffer de fibrilación, se observó la morfología de los agregados de oxWt(f) y oxK107del(f) por TEM (A y C respectivamente) y AFM (B y D). Las barras en las figuras de TEM representan 100 nm. Las barras Blanco-Negro a la derecha en las imágenes AFM representan la escala de la altura en cada figura. Las flechas blancas discontinuas, blancas continuas y negras continuas en A) representan agregados oligoméricos, protofibrilares o fibrilares, respectivamente. Las flechas negras delgadas y gruesas en B) señalan pequeñas estructuras oligoméricas de 5–15 nm de altura y especies de mayor altura, respectivamente. Los histogramas al lado derecho de las imágenes AFM muestran la medición en el plano Z de las áreas marcadas con líneas discontinuas, utilizando el software Nanoscope. Recuadro en D): mayor aumento de una fibra.

3. 6 Discusión

En el presente estudio, nos propusimos caracterizar cómo las condiciones locales de un entorno inflamatorio crónico pueden alterar la estructura del plegamiento nativo de apoA-I, induciendo su agregación y disfunción en las placas ateroscleróticas. Para este análisis deben considerarse factores comunes: 1) modificaciones químicas debidas a ROS liberados por leucocitos activados, entre las que se encuentran la oxidación (Chan y col. 2015b); 2) modificaciones intrínsecas causadas por mutaciones hereditarias en la secuencia de la proteína que puedan aumentar su tendencia a un plegamiento anómalo o funcionar incorrectamente. En esta tendencia, el mutante de delección K107del se identificó como un buen modelo de estudio-objetivo, ya que se asocia con aterosclerosis grave en los pacientes (Ljunggren y col. 2014; M Tilly-Kiesi y col. 1997). Los estudios realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* no han determinado completamente las razones del fracaso de la apoA-I para cumplir el papel ateroprotector ni el incremento en la gravedad de las lesiones asociadas a la variante de delección.

Aunque el fenotipo de aterosclerosis severa observado en los pacientes portadores de apoA-I K107del se atribuía a los niveles de HDL en general por debajo del valor considerado normal (Ljunggren y col. 2014; Nofer y col. 1995; M Tilly-Kiesi y col. 1997), este perfil lipídico no siempre fue homogéneo y en ocasiones con discrepancias entre los ensayos. Mientras que Rall y col. encontraron una eficiencia reducida de K107del aislado para activar LCAT *in vitro* (Rall y col. 1984), esta función fue hallada similar a Wt en otros estudios (Huang y col. 2001; Tilly-Kiesi y col. 1995). En una tendencia similar, se informó que la afinidad de unión a lípidos de la variante disminuyó (Huang y col. 2001) o fue similar a Wt (Gorshkova et al 2014). La delección no alteró significativamente la remoción de colesterol a partir de cultivos celulares utilizados como modelo (Gonzalez y col. 2008b; Jonas y col. 1993). En otros pacientes, este mutante se asoció con hipertrigliceridemia (Nofer y col. 1995), y los estudios *in vitro* apoyaron un aumento de la unión a partículas ricas en triglicéridos (Gorshkova et al 2014). Estos hallazgos sugieren que, además de la menor eficiencia que la mutación pueda inducir en las funciones normales de apoA-I, el efecto no parece ser drástico. La proteína Wt que también está presente en individuos heterocigotos con una prevalencia diferente del alelo mutado sobre el normal en todos los individuos afectados puede contrarrestar cambios menores, lo que podría explicar, al menos en parte, la variedad en las observaciones de los pacientes. Las vías involucradas en las manifestaciones clínicas que hacen a K107del pro-amiloidogénica y pro-aterogénica no son completamente conocidas y sin dudas sub exploradas ya que en este tipo de amiloidosis por apoA-I, y dada la

especial localización de los agregados, no se arriba al diagnóstico por biopsia (Westermarck et al. 1995).

En nuestro grupo testeamos inicialmente la hipótesis de que la pérdida del residuo positivo en la posición 107 induce un cambio estructural que afecta el plegamiento y la función de las proteínas. De acuerdo con informes anteriores propios y de otros, los datos apoyan una estructura más flexible inducida por la pérdida del residuo (Gorshkova, Mei, y Atkinson 2014; Ramella y col. 2012). Como indica la Figura 3.5 hay una menor eficiencia de entrecruzamiento químico intercatenario *in vitro*, lo que nos indicaría un plegamiento tridimensional que es más relajado en el mutante que en la proteína apoA-I Wt (Díaz Ludovico y col. 2020). El pequeño desplazamiento hacia el rojo en la fluorescencia intrínseca del Trp de K107del que se muestra aquí (Figura 3.6) también apoya una estructura más flexible de la conformación monomérica.

Basado en el modelo de clase A de hélices α , K107 debería estar comprendida en un segmento de las hélices anfifílicas repetidas de 22 residuos (Segrest y col. 1992). Las simulaciones tradicionales de rueda de la hélice predicen que la eliminación de este residuo induce un desplazamiento de $\sim 90^\circ$ del eje de la hélice, alterando la naturaleza y la orientación de la cara hidrófoba respecto a la polar (Rall y col. 1984). Más recientemente, el análisis basado en la estructura cristalográfica informada de la apoA-I truncada C-terminal (Mei y Atkinson 2011) sugirió que esta mutación induciría un debilitamiento de las redes de puentes salinos (Gorshkova et al 2014). Se desconoce si uno o todos los modelos predicen el efecto de la mutación y debe estudiarse más a fondo. Llamativamente, cuatro mutaciones de sustitución natural de residuos cercanos al 107 (D103N, W108R, E110K, incluida la sustitución de K107 por un M) se informaron cómo no asociados con amiloidosis o aterosclerosis (Matsunaga y col. 2010b; Sorci-Thomas y col. 2002). Por lo tanto, el desorden de la estructura de la proteína debido a la eliminación del residuo K107 parece ser importante para determinar la agregación de la proteína.

A pesar del cambio estructural observado, ni la solubilización de lípidos aquí reportada, ni la inducción de pérdida de contenido desde vesículas recientemente informada en trabajos del grupo (Díaz Ludovico y col. 2020) se ven significativamente afectadas por la mutación, por lo que la interacción con bicapas lipídicas no parece estar drásticamente afectado en esta variante natural. En el mismo sentido, el producto del reordenamiento de K107del con DMPC no difirió drásticamente del Wt (no mostrado), lo que concuerda con los informes que muestran alteraciones menores en la salida de colesterol (Gonzalez y col. 2008b). Sin embargo, este hecho no excluye que en condiciones especiales (probablemente relaciones de lípido a proteína inferiores u otras

composiciones lipídicas) las anomalías en la migración de lipoproteínas detectadas en algunos pacientes puedan manifestarse.

Como mencionamos, el hallazgo de HDL y apoA-I disfuncionales en la placa aterosclerótica sugiere que la proteína puede ser una víctima del escenario proinflamatorio. Sería esperable, en primer término, que la oxidación pueda afectar al plegamiento nativo de las proteínas. Como se muestra en la Figura 3.5, podríamos sugerir una pérdida en la capacidad de adquirir una conformación funcional de dímero. Sin embargo, se deberán llevar a cabo estudios de más profundidad para asegurar esta afirmación. De manera interesante, y en asociación a lo anterior, la proteína oxidada no pierde la capacidad de solubilizar lípidos, sino que parece aumentar la afinidad de unión a liposomas cuando la proteína Wt (y se observa de manera similar para K107del) fue oxidada bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 3.9). Se desconocen las razones de este comportamiento pero podría sugerirse, de acuerdo con otros autores, que la introducción de una carga negativa al oxidarse (grupos sulfóxido) en el lugar de Met no polar en el límite entre una cara polar y una no polar (como ocurre con M86 y M112), puede alterar su afinidad con bicapas (Panzenböck y col. 2000). En concordancia con esta hipótesis, hemos informado recientemente un comportamiento similar cuando el residuo Leu, no polar, fue sustituido por un Arg, polar en posición L60 (Gaddi y col. 2020).

De acuerdo con Gorshkova y colaboradores (Gorshkova y col. 2014), nuestros resultados sugieren una conformación terciaria débilmente plegada de esta variante en comparación con el Wt (Ramella y col. 2012). Como se esperaba, los grupos polares (sulfóxido) debido a la oxidación de Met pueden dar como resultado una pérdida adicional de superficies hidrofóbicas como lo sugieren nuestros ensayos de incubación con ANS y Bis-ANS (Figura 3.7), lo que también puede alterar la disposición nativa. Las sondas ANS son además especialmente sensibles a los "estados de glóbulos fundidos" flexibles (Martins y col. 2003). Un ligero aumento en la flexibilidad debido a la alteración de la proteína puede permitir una mayor penetración del ANS dentro de Wt y, por lo tanto, como consecuencia, la fluorescencia asociada al ANS sigue siendo similar tanto en especies nativas como oxidadas (Figura 3.7.A). Si este cambio estructural no es drástico, podría no favorecerse la permeación del dímero voluminoso Bis-ANS, lo que explica la poca diferencia en la emisión de fluorescencia entre Wt y oxWt (Figura 3.7.B). Con la misma lógica, la mayor intensidad observada con la K107del apoya una estructura más flexible. Una vez oxidada, K107del perdería significativamente bolsillos hidrofóbicos.

Como se esperaba, la oxidación resulta en un desplegamiento parcial o desestabilización de la estructura secundaria de apoA-I Wt (Wong y col. 2010) y acá mostramos que la oxidación también afecta la conformación de la variante K107del

(Figura 8). Anteriormente demostramos que, mientras que Wt forma pequeños oligómeros, K107del se agrega como complejos de tipo amorfo con algunas protofibras después de una incubación a corto plazo a pH fisiológico (Ramella y col. 2012). Sin embargo, esta tendencia creciente al mal plegado no es suficiente para explicar la génesis de las conformaciones fibrilares en la aorta de los pacientes (Das y col. 2014). Por lo tanto, en este trabajo, nos propusimos caracterizar las conformaciones de agregación obtenidas después de 30 días de incubación de proteínas bajo el protocolo de oxidación de Chan y col. (Chan y col. 2015a). La cinética de formación de estructuras amiloides seguida de ThT y absorbancia indicó que, bajo nuestras condiciones experimentales, se requería de la oxidación para obtener complejos tipo amiloide con mayor rendimiento para K107del (Figura 3.10.A y B).

Como se desprende de las Figuras 3.11.A y B, los agregados de Wt estaban representados principalmente por protofibrillas, pequeña cantidad de fibrillas y especies oligoméricas, de acuerdo con Chan y col. (Chan y col. 2015a). Este tipo de compuestos oligoméricos predominó cuando se observó por AFM (Figura 3.11.B). La diferencia entre los rendimientos relativos de las especies observadas en ambas técnicas de microscopía podría ser explicada por cierta heterogeneidad debida al proceso de observación. Como Giehm y colaboradores sugiere (Giehm y col. 2011) pueden ser posibles pequeñas variaciones en la tasa de nucleación de muestras idénticas, o puede postularse que la naturaleza diferente de las cuadrículas utilizadas para la observación TEM (película de Formvard hidrofóbica) versus la mica cargada negativamente utilizada para la obtención de imágenes de AFM, puede introducir una unión selectiva de algunos agregados con respecto a los otros presentes en la muestra. Asimismo, se detectó un alto rendimiento de fibras del mutante oxK07del con casi ninguna conformación oligomérica utilizando ambos enfoques microscópicos (Figura 3.11.C y D). Como Wong y colaboradores han observado, los agregados parecen ser fibrilares con un alto grado de curvatura de fibrillas y una apariencia de tipo "cinta" (Wong y col. 2010). Notablemente a pesar de que lo observado para la mayoría de las proteínas proamiloidogénicas, el aumento en la hoja β , no parece ser crítico para apoA-I. Petrlova y colaboradores han demostrado que las fibrillas formadas con apoA-I Leu178His de longitud completa contienen predominantemente una estructura helicoidal α (Petrlova y col. 2012). Ellos afirman, a través de sus ensayos, que las estructuras fibrilares pueden ser también un conjunto de monómeros α helicoidales.

Sería lógico que la conformación final y estable de la proteína fibrilar aislada de los tejidos de los pacientes pueda ser el resultado de una enfermedad crónica compleja de eventos que involucran procesamiento postraducciona, interacciones con ligandos fisiológicos, etc. Por lo tanto, a pesar de que una estructura fibrilar clara es representativa

de nuestra condición experimental, es posible que las incubaciones prolongadas u otras modificaciones químicas, produzcan una proteína diferente y con una conformación más insoluble. La presencia de apoA-I en asociación con características específicas de amiloides entre placas ateroscleróticas sugiere fuertemente que el medio prooxidante que produce la lesión puede inducir una concentración local más alta de apoA-I. Esto podría disminuir la función de la proteína o inducir una conformación que es propensa a agregarse dentro de la lesión. Podría proponerse, además, que la tasa catabólica más rápida de K107del refleja la liberación de una proteína libre de lípidos que, cuando es oxidada por especies reactivas en el medio, forma una estructura propensa a la agregación.

Aquí describimos por primera vez la estructura de una conformación fibrilar obtenida a partir de la oxidación de la variante K107del. Se podría hipotetizar que los neutrófilos o macrófagos activados (ya sea de una lesión previa o inducidos por las variantes patológicas solubles) liberan MPO que oxida las proteínas favoreciendo la formación de variantes amiloides fibrilares. De hecho, esto puede dar lugar a la alimentación de nuevas respuestas proinflamatorias. Aún no se sabe si las fibrillas amiloides maduras funcionan como reservorio de especies tóxicas oligoméricas más pequeñas que se propagan por desintegración de fibrillas. Se realizarán más investigaciones para obtener una visión profunda de este tema.

Capítulo 4:
Capacidad de las variantes pro-amiloidogénicas de apoA-I y
sus posibles conformaciones en establecer una respuesta
inflamatoria

Una parte de este capítulo ha sido adaptado de:

“Fibrillar conformation of an apolipoprotein A-I variant involved in amyloidosis and atherosclerosis”. GISONNO, et al BBA, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129515>

4.1. Resumen

La apoA-I es una proteína multifuncional que interacciona con numerosos ligandos, como hemos mencionado anteriormente. La existencia de variantes puntuales asociadas a amiloidosis nos permite pensar que dichas mutaciones puedan afectar su interacción en el microentorno y, a su vez, hacerla más sensible a sufrir eventos que las desestabilicen. La causa que desencadena que una proteína como apoA-I se deposite en placas amiloides y ateroscleróticas no se conoce en la actualidad. Sin embargo, vasta bibliografía y ensayos previos del grupo, apoyan la asociación entre la amiloidosis y los procesos inflamatorios crónicos.

Continuamos nuestros estudios con la variante K107del, única en desarrollar amiloidosis y aterosclerosis severa, por lo que constituye un excelente modelo para indagar sobre estas patologías crónicas e inflamatorias. Aquí nos dedicamos a evaluar si las variantes pro-amiloidogénicas de apoA-I estudiadas son capaces de estimular células humanas y generar una respuesta inflamatoria. Para ello contamos con un sistema muy bien caracterizado de distintas conformaciones de apoA-I Wt y K107del, y líneas celulares humanas endoteliales, de monocitos, además de neutrófilos aislados de sangre periférica.

Nuestros resultados hasta el momento nos permiten tener conclusiones importantes acerca del mecanismo que podría iniciar un proceso inflamatorio, el cual se retroalimentaría positivamente induciendo oxidaciones sobre apoA-I. Como hemos demostrado anteriormente, la exposición de la proteína y su variante K107del a un escenario oxidativo como el de un entorno celular pro-inflamatorio crónico (que la misma conformación es capaz de generar), podría explicar la asociación entre dos enfermedades como es la amiloidosis y la aterosclerosis.

4.2. Introducción

La presencia de apoA-I como agregados amiloides en placas ateroscleróticas aórticas seniles (Mucchiano y col. 2001) ha abierto el interrogante sobre un posible rol pro-amiloidogénico de la proteína asociado al micro entorno. En base a los hallazgos reportados en este trabajo, se puede postular que las modificaciones químicas en el microambiente inflamatorio, como son las oxidaciones, pueden alterar la estructura de las variantes marginales de apoA-I y promover su agregación. Resultados de nuestro grupo de investigación y de otros autores han demostrado que ciertos eventos como es la proteólisis, la presencia de determinados solutos (o crowding), el descenso de pH, la unión de ligandos de distinta naturaleza, etc. podrían también mediar en la formación de una estructura proteica anómala (Chan y col. 2015b; Ramella y col. 2011).

Las reacciones asociadas a una respuesta inflamatoria podrían ser las responsables del proceso crónico de nucleación de apoA-I que culmina con la formación de fibras insolubles y patológicas. Estos eventos desplazan el perfil de la proteína desde una estructura funcional hacia otra con pérdida de función y/o citotoxicidad. Dada la distinta localización y grado de severidad de la patología asociada a las variantes naturales de apoA-I, podría proponerse que existirían mecanismos comunes que afecten el plegamiento de todas las variantes, y otros eventos locales que promuevan la agregación asociada a distintos órganos.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que algunas, pero no todas las variantes estudiadas de apoA-I en estado monomérico, pueden inducir liberación de interleuquinas pro-inflamatorias a partir de modelos de cultivos de macrófagos (Gaddi et al. 2020; Ramella y col. 2012). Estos hallazgos abren la siguiente incógnita: ¿podrán las mutantes puntuales ser capaces por sí solas, a través de sus plegamientos anómalos, de disparar una respuesta de tipo inflamatoria que perpetúe la lesión? A pesar de las funciones protectoras que se han informado sobre la apoA-I en las HDL, la asociación de esta proteína a una patología altamente prevalente como es la aterosclerosis, nos llevan a indagar sobre el efecto de las conformaciones anómalas en un medio ambiente celular. Se han informado otras estructuras amiloides capaces de generar la activación de células del sistema inmune (Gustot et al. 2013), pero no existe información acerca de las fibras amiloides de apoA-I. Por lo expuesto, en este capítulo nos proponemos evaluar la hipótesis que distintas conformaciones de apoA-I pueden activar a células del sistema inmune induciendo una respuesta pro-inflamatoria. Dada la crítica participación de esta proteína en el mantenimiento de la función endotelial, consideramos testear tipos celulares que puedan estar involucrados en este proceso. Para ello empleamos una línea endotelial humana de microvasculatura (HMEC-I), macrófagos diferenciados de una

línea celular de monocitos (THP-1) de origen humano y neutrófilos aislados de sangre periférica de donantes voluntarios. Evaluar el comportamiento de las estructuras fibrilares logradas en un microambiente celular nos permitirá responder otros interrogantes que se desprenden de nuestras observaciones: ¿cuál es la correlación entre monómero y fibra? ¿Es la fibra la especie final y citotóxica, o una estrategia para disminuir una conformación soluble que media eventos celulares que conlleven al daño orgánico?

4. 3. Objetivos

4. 3. 1. Objetivo general

El objetivo general es indagar en la interrelación entre conformaciones proteicas y participantes del micro entorno vascular en el establecimiento de un ambiente pro inflamatorio asociado a amiloidosis-aterosclerosis

4. 2. 1. Objetivos específicos

Proponemos determinar la participación diferencial de las proteínas en estudio (variante amiloidogénica y conformaciones soluble y fibrilar) en la inducción de respuestas celulares. Para ello los objetivos específicos son los siguientes:

Analizar la participación diferencial de las proteínas para iniciar una respuesta del tipo inflamatoria en cultivos de monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos.

Estudiar la capacidad de las distintas variantes para inducir posibles efectos citotóxicos sobre células endoteliales y macrófagos humanos.

Determinar si las distintas conformaciones proteicas puedan activar un fenotipo pro-inflamatorio sobre células endoteliales.

Estudiar si las variantes de apoA-I son capaces de desencadenar la activación de neutrófilos como parte de la respuesta inmune.

Proponer una probable interrelación entre los eventos mencionados.

4. 4. Materiales y métodos

4. 4. 1. Materiales

Los reactivos químicos fueron de la mayor calidad analítica disponible obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO): lipopolisacárido (LPS), sulfato de polimixina y 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2, Bromuro de 5-difeniltetrazolio (MTT). Inmunoensayo enzimático específico de BD Biosciences (San Diego, CA). Antibiótico-antimicótico, Invitrogen, (Carlsbad, CA) y factor de crecimiento endotelial de Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

4. 4. 2. Obtención de apoA-I de tipo salvaje (Wt) y K107del recombinantes

Las proteínas Wt y K107del se expresaron y se purificaron como se describió anteriormente en la sección 3.4.2.

4. 4. 3. Obtención de las conformaciones proteicas de apoA-I

La oxidación química se realizó por incubación de las proteínas Wt y K107del en una relación de 1:10,000 de proteína:H₂O₂ a 37 ° C durante 12 h, como se describió en la sección 3.4.3.

Con el objetivo de lograr estructuras fibrilares, las variantes de apoA-I oxidadas se incubaron a 28 μM en el buffer de fibrilación, en condiciones estériles durante 30 días, con agitación en un termomezclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 37 ° C, 500 rpm. Una vez finalizado el tiempo de incubación se verificó la presencia de estructuras fibrilares a través de técnicas biofísicas, como uso de la sonda ThT y por TEM. En todos los casos se obtuvieron estructuras reproducibles y similares a las mostradas en los capítulos anteriores.

4. 4. 4. Activación de respuesta pro-inflamatoria mediada por variantes de apoA-I en THP-1.

Un mecanismo general de patogenicidad propuesto para proteínas amiloidogénicas es la participación en la activación de respuesta inflamatoria (Lee y col. 2009; Reed-Geaghan y col. 2009). A fin de profundizar estos estudios, se incubaron distintas conformaciones de apoA-I Wt y K107del con cultivos de monocitos de origen humano (THP-1), previamente diferenciados a macrófagos. Este modelo fue elegido

dado que es ampliamente caracterizado en bibliografía, proviene de una línea a partir de células humanas, y que cumple con el fenotipo requerido para estos ensayos (Daigneault y col. 2010). Se analizaron señales celulares que son características de la reacción inflamatoria, como es la liberación de interleuquinas y la producción de ROS.

La línea celular de monocitos humanos THP1 se adquirió comercialmente (ATCC) y para todos los casos se utilizaron células provenientes de cultivos menores a 15 pasajes. Los stocks celulares originales se obtuvieron por una única expansión de un criovial original y se almacenaron en N₂ (l) hasta su descongelado. Se crecieron las células en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y conteniendo una mezcla de antibiótico-antimicótico (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) y mantenidas en estufa a 37°C y 5% CO₂.

Para los ensayos se sembraron en placas de 48 wells en una concentración de 1x10⁶ células/ml, 48 h previas se incubaron con PMA (ésteres de forbol, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)) a una concentración final de 5ng/ml, y se incubaron a 37°C para diferenciarlas a macrófagos, (los cuales crecen en monocapa adheridas). Como control positivo de activación de respuesta celular se utilizó lipopolisacárido bacteriano (LPS) y como control negativo el LPS se adicionó en presencia de polimixina B, antibiótico que se une e inhibe la acción del LPS. Este antibiótico se adicionó a las muestras incubadas con las proteínas para eliminar los efectos de una posible contaminación con pequeñas cantidades de endotoxinas remanentes luego de la purificación de las proteínas recombinantes. Las células fueron incubadas con proteínas Wt y K107del en sus conformaciones solubles y fibrilares, a 1 µg/ml durante 3 h, filtradas previamente a esterilidad. Se extrajo el sobrenadante y se dosaron las citoquinas TNF-α e IL-1β mediante ensayo de inmunoadsorción (ELISA), según el protocolo descrito en cada kit (eBioscience, San Diego, CA). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Luego de extraído el sobrenadante, se determinó la viabilidad celular luego de las 3 h de incubación con las variantes, empleando como control de muerte H₂O₂ y utilizando la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (ver anexo).

Con el objetivo de determinar si las variantes en las conformaciones ensayadas eran capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) se empleó la sonda diclorofluorescein-diacetato (DCFDA) para cuantificarlos (ver anexo).

4. 4. 5. Estudio de la citotoxicidad y expresión de moléculas de adhesión causada por las variantes de apoA-I en células endoteliales humanas.

Como fue descrito en la introducción de este trabajo, la apoA-I imita varias funciones de la HDL en la protección de la actividad endotelial. Sin embargo, nos propusimos testear la hipótesis de que una conformación anómala de la proteína puede resultar en la pérdida de dicha función estableciendo un micro entorno citotóxico o inflamatorio. A fin de estudiar comparativamente la probable inducción de respuesta pro inflamatoria de las distintas conformaciones proteicas, se utilizó un modelo establecido de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1). Las células endoteliales tienen un rol crítico en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Galley y Webster 2004). Lejos de ser elementos pasivos o espectadores inocentes en procesos patológicos, son activos en la creación, modulación y probablemente terminación de la inflamación (Pober y Sessa 2007). Los detalles de la forma en que las células endoteliales participan en estos procesos aún no se comprenden completamente. Los estudios que utilizan células endoteliales microvasculares han revelado una serie de diferencias importantes entre las que tapizan de vasos grandes y pequeños, incluida su capacidad para formar tubos, el perfil secretor de prostaglandinas, los requisitos de crecimiento *in vitro* y, quizás lo más importante, la expresión, regulación y función de las moléculas de adhesión celular en su superficie (Swerlick y Lawley 1993; Xu y col. 1994). Por lo tanto, aunque se han obtenido muchos conocimientos valiosos mediante estudios *in vitro* de células endoteliales de vasos grandes humanos, la mayoría de los eventos fisiológicos y fisiopatológicos tienen lugar a nivel de la microvasculatura, la cual constituye la gran mayoría del compartimento vascular humano (Ades y col. 1992). Nuestro modelo de estudio, la línea celular HMEC-I, nos permitió evaluar si la apoA-I era capaz de afectar la viabilidad de un endotelio celular. Estas células poseen el fenotipo apropiado y fueron incluso previamente reconocidas como excelente modelo para estudios funcionales de HDL (Muñoz-Vega et al. 2018) lo que nos permitió una primera aproximación al estudio de conformaciones que no habían sido previamente analizadas.

Las células se cultivaron en medio MCDB-131 con 10% de SFB, hidrocortisona, glutamina, mezcla de antibiótico-antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA) y factor de crecimiento endotelial (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Para determinar la viabilidad celular, las células se sembraron en 50000 cel/well empleando una placa de 96 wells y se incubaron con las distintas variantes de apoA-I y conformaciones durante 24 h. Como control de muerte se empleó H₂O₂ (Chen y col. 2010). Se empleó el método de reducción del MTT y Resazurina (ver anexo).

A fin de evaluar el efecto de las proteínas sobre la organización celular, se observaron por microscopía óptica las monocapas celulares luego de las incubaciones. La morfología normal de las células HMEC-I es indistinguible de células endoteliales no inmortalizadas (no transformadas), pueden desarrollar hiperconfluencia ante un análisis microscópico, pero conservan la característica “morfología de adoquines” (Ades y col. 1992).

La expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales es un paso fundamental para reclutar células del sistema inmune y establecer una respuesta inflamatoria (Shi y Pamer 2011). Se evaluó si las células endoteliales responden a las variantes de apoA-I estableciendo un fenotipo pro-inflamatorio a través de la confirmación de la expresión de moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Una vez que las células fueron incubadas por 24 h con las proteínas (a 1 µg/ml), las monocapas en cada well se lavaron con PBS estéril, se despegaron por raspado mecánico y se lisaron empleando un buffer de lisis (ver anexo). Como control positivo de expresión de ICAM-I empleamos LPS a una concentración de 1µg/ml. El análisis se llevó a cabo por la técnica de Western Blot (ver anexo) utilizando anticuerpos específicos. Para descartar diferencias debido a distintas cantidades de muestra en cada punto experimental se determinó comparativamente la expresión de β-actina (control de carga).

4. 4. 6. Estudios formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

La activación de neutrófilos ante un patógeno puede ser manifestada por la formación de NETs. En este trabajo consideramos la posibilidad de que una respuesta pro-inflamatoria “estéril” pueda ser desencadenada por especies proteicas mal plegadas. Los neutrófilos humanos de donantes sanos se aislaron como se describe anteriormente (Gorgojo y col. 2017a). La sangre heparinizada se centrifugó en un gradiente de Ficoll-Histopac (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y eliminación de eritrocitos contaminantes mediante lisis hipotónica. La viabilidad celular fue del 99% según lo determinado por la prueba de exclusión de azul de Tripan. Antes de los ensayos funcionales, las células se lavaron dos veces con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Thermo Scientific, Waltham, MA) y se suplementaron con SFB al 10%. El SFB utilizado fue inactivado por calor para eliminar nucleasas. La ausencia de nucleasas termoestables se confirmó como en von Kockritz-Blickwede y colaboradores. (Von Kockritz-Blickwede, Chow, y Nizet 2009). Todos los procedimientos que involucran muestras humanas fueron de acuerdo con los estándares éticos de la declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores, y aprobados por la Junta de Revisión Institucional. Todos los

individuos dieron su consentimiento informado por escrito para la recolección de muestras y su posterior análisis.

Los estudios de formación de NET se realizaron como fue descrito por otros autores (Brinkmann y col. 2004; Gorgojo y col. 2017b). Brevemente, se sembraron neutrófilos (2×10^5 cel/well) en placas de 24 wells que contenían cubreobjetos y se incubaron con cada proteína (14 μ M) a 37 °C durante 3 h. Los neutrófilos incubados con o sin ésteres de forbol (PMA) a una concentración de 20 nM, fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente. Se usó microscopía de fluorescencia para observar células NETóticas. Se llevó a cabo la inmunotinción de las células para los diferentes puntos de incubación. Para ello las muestras se fijaron y se permeabilizaron usando una solución de permeabilización (PBS que contiene 0.1% (p/v) de saponina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y 0.2% (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)). Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpos anti-elastasa de neutrófilos humanos (NE) (policlonales obtenidos de conejo), durante 30 min a 25°C en presencia de solución permeabilizante. Después de dos pasos de lavado, los neutrófilos se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra, anti-conejo conjugado con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), en presencia de una solución permeabilizante durante otros 30 min a 25°C, y se lavaron dos veces. Finalmente, las muestras se incubaron con yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a una concentración de 2 mg/ml en PBS durante 5 min, para detectar ADN nuclear.

La cuantificación de los neutrófilos que se sometieron a NETosis se realizó utilizando el software de procesamiento de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU., [Http://imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)). Las imágenes de microscopía de fluorescencia capturadas con un objetivo de 40X se utilizaron para medir el área nuclear individual de neutrófilos teñidos con yoduro de propidio. El tamaño promedio del área nuclear de neutrófilos en reposo se eligió como valor de corte. Las áreas del núcleo celular con tamaños mayores que este valor de corte se consideraron células NETóticas. Esta correlación se confirmó comprobando si las células elegidas al azar con un área nuclear que excedía el valor de corte mostraban una colocalización de cromatina con la proteína granular NE asociada a NETs. Se examinaron al menos 400 células de cada condición.

4. 4. 7. Análisis estadístico

Los resultados se reprodujeron en tres experimentos independientes y se informan como medios de triplicado \pm error estándar. ANOVA o la prueba de Student evaluaron las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

4. 5 Resultados

4. 5. 1 Toxicidad y activación de respuesta pro-inflamatoria mediada por variantes de apoA-I en macrófagos humanos.

Para determinar si las variantes de apoA-I son capaces activar a los macrófagos y así inducir una respuesta del tipo inflamatoria, ensayamos la producción de citoquinas TNF- α e IL-1 β a partir de la línea celular de monocitos humanos THP-I. La liberación de citoquinas podría ser clave para perpetuar un microambiente pro-inflamatorio que incremente el daño local. Estudios previos del grupo indican que el mutante G26R induce (en su estado monomérico) IL-1 β y TNF- α de macrófagos murinos en cultivo (Ramella y col. 2018).

Luego de ser diferenciadas a macrófagos, las células fueron incubadas con proteínas Wt y K107del en sus conformaciones solubles y fibrilares, a 1 μ g/ml durante 3 h. Como la Figura 4.1 indica no se evidenció liberación significativa de estas citoquinas al ser incubadas con las distintas conformaciones proteicas de apoA-I en las condiciones ensayadas.

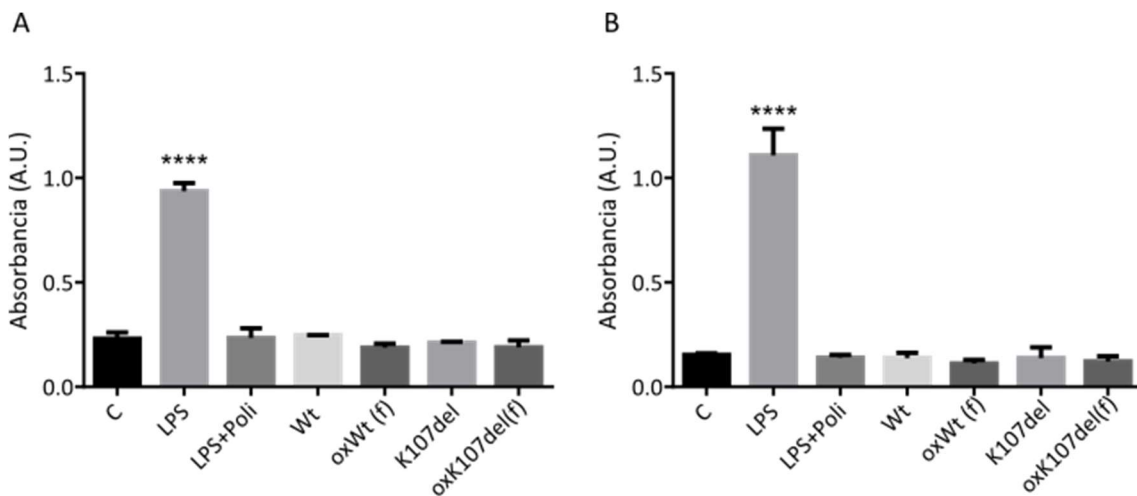


Figura 4.1. Cuantificación de las citoquinas liberadas por macrófagos humanos incubados con apoA-I Wt y K107del solubles y fibrilares. Posterior a la activación de los monocitos THP-I, se incubaron con las proteínas a 1 μ g/ml durante 3 h. Se extrajo el sobrenadante y se realizó el ensayo de ELISA para TNF- α (A) e IL-1 β (B), según el protocolo descrito en cada kit (eBioscience, San Diego, CA).

Una vez extraído el sobrenadante celular, se controló la viabilidad por la técnica de reducción de MTT. En la Figura 4.2 se observa que los tratamientos con las distintas conformaciones no afectaron la viabilidad celular en las condiciones ensayadas.

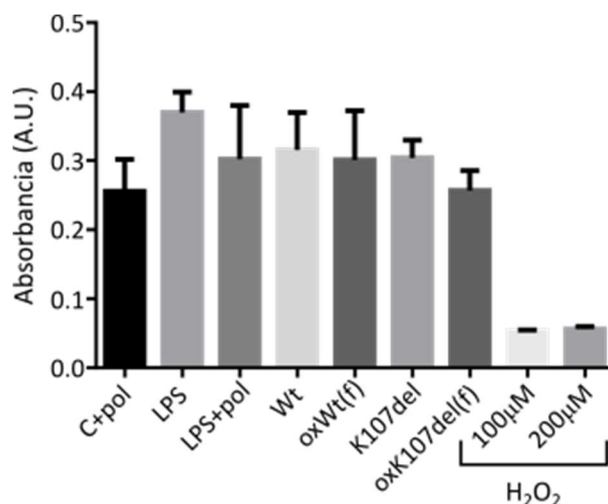


Figura 4.2. Cuantificación viabilidad celular de los macrófagos humanos previamente incubados con apoA-I Wt y K107del solubles y fibrilares. Una vez realizado el ensayo de ELISA para cuantificar las citoquinas, se verificó que las células estuvieran viables, mediante el método de reducción de MTT.

Por último, con el fin de evaluar si las estructuras proteicas eran capaces de generar especies reactivas de oxígeno, utilizamos la sonda DCFDA para cuantificarlo. De igual manera que en los ensayos previos, no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos con proteínas y el control negativo bajo las condiciones utilizadas (tiempo de incubación 4h).

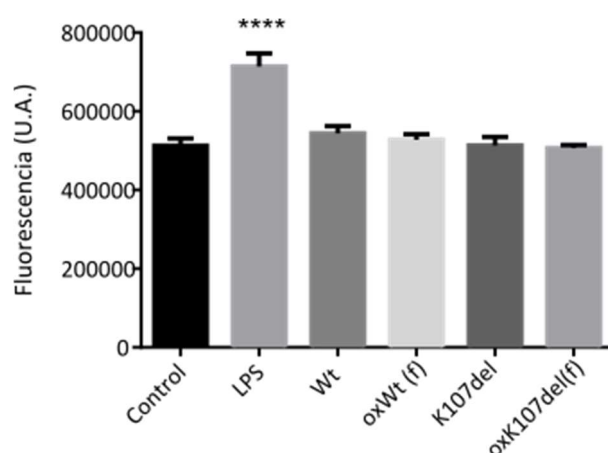


Figura 3. Cuantificación de ROS liberados por macrófagos humanos incubados con apoA-I Wt y K107del solubles y fibrilares. Posterior a la activación de monocitos THP-I, se incubaron con las proteínas a 1µg/ml durante 3 h. Una vez extraído el sobrenadante, las células fueron lavadas con PBS estéril y se incubaron con la sonda DCFDA siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Por último, se midió la emisión de fluorescencia en un lector de microplacas con filtros de emisión y excitación centrados a 485 y 535 nm respectivamente

4. 5. 2. Influencia de variantes de apoA-I sobre la relación viabilidad-citotoxicidad de células endoteliales microvasculares.

A fin de poner de manifiesto una probable activación de respuesta pro-inflamatoria como mecanismo de toxicidad, se evaluó la posibilidad que las proteínas recombinantes nativas y la variante de deleción fueran capaces de generar una respuesta citotóxica a nivel mitocondrial. Analizamos el efecto de la incubación de las conformaciones solubles de las proteínas sobre la viabilidad endotelial mediante el método de MTT descrito en el anexo.

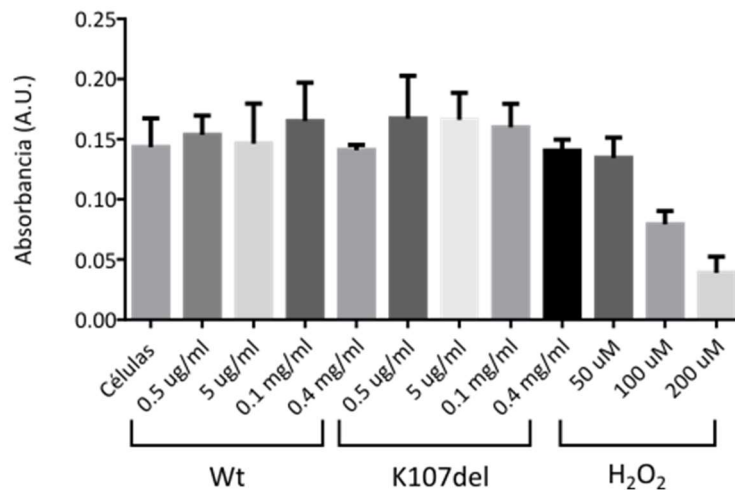


Figura 4.4. Cuantificación de la viabilidad celular de células endoteliales (HMEC-I) incubadas con diferentes concentraciones de apoA-I Wt y K107del solubles. A) Se empleó el método de reducción de MTT, cuantificando absorbancia a 570nm. Como control de muerte se empleó H₂O₂.

En este caso no observamos diferencias significativas en ninguna de las concentraciones proteicas ensayadas en un amplio abanico de concentraciones abarcadas (Figura 4.4). Resultados similares fueron obtenidos mediante el método de Resazurina (no mostrado).

Una vez realizado el análisis a altas concentraciones proteicas y verificar que las proteínas monoméricas no afectan la viabilidad celular, decidimos estudiar si las conformaciones fibrilares halladas durante este trabajo de tesis podrían inducir citotoxicidad. Como la Figura 4.5 muestra, la viabilidad celular endotelial no se ve afectada incluso a altas concentraciones de proteínas, ya sea en estado nativo o en conformaciones fibrilares.

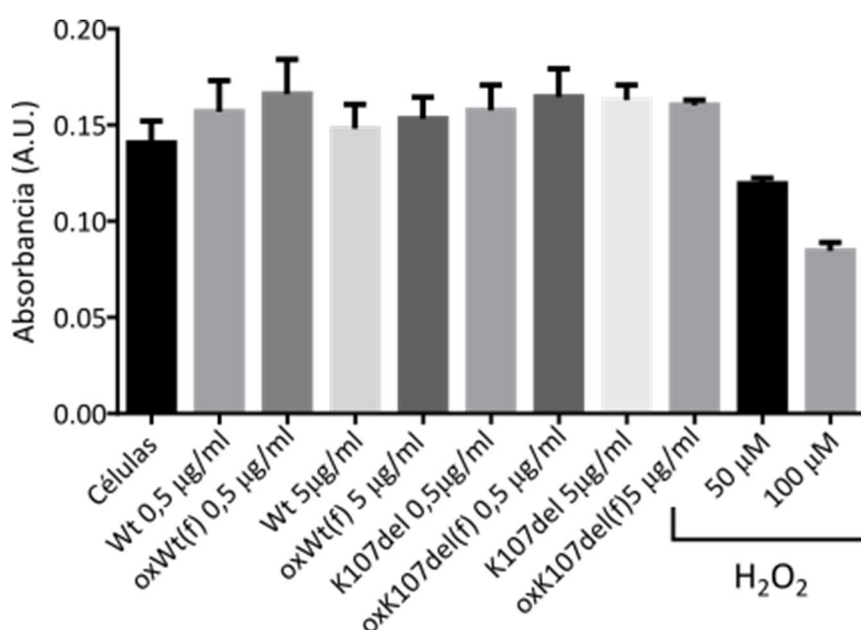


Figura 4.5. Cuantificación de la viabilidad celular de células endoteliales (HMEC-I) incubadas con diferentes concentraciones de apoA-I Wt y K107del solubles y fibrilares. La viabilidad de las células fue evaluada por MTT, ensayando dos concentraciones de proteínas: 0.5 µg/ml y 5µg/ml. Como control de muerte se empleó H₂O₂.

4. 5. 3. Expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales mediada por variantes de apoA-I.

Las células endoteliales microvasculares en un sitio de inflamación son tanto participantes activos como reguladores de los procesos inflamatorios (Poher y Sessa 2007). Decidimos evaluar si las conformaciones de apoA-I podrían inducir un aumento en la expresión de moléculas de adhesión por parte del endotelio, mecanismo clave para el inicio de una respuesta inflamatoria. Como se observa en la Figura 4.6, la incubación

de estas células con la estructura fibrilar de apoA-I K107del (oxK107del(f)) resultó en un aumento significativo de la expresión ICAM-I.

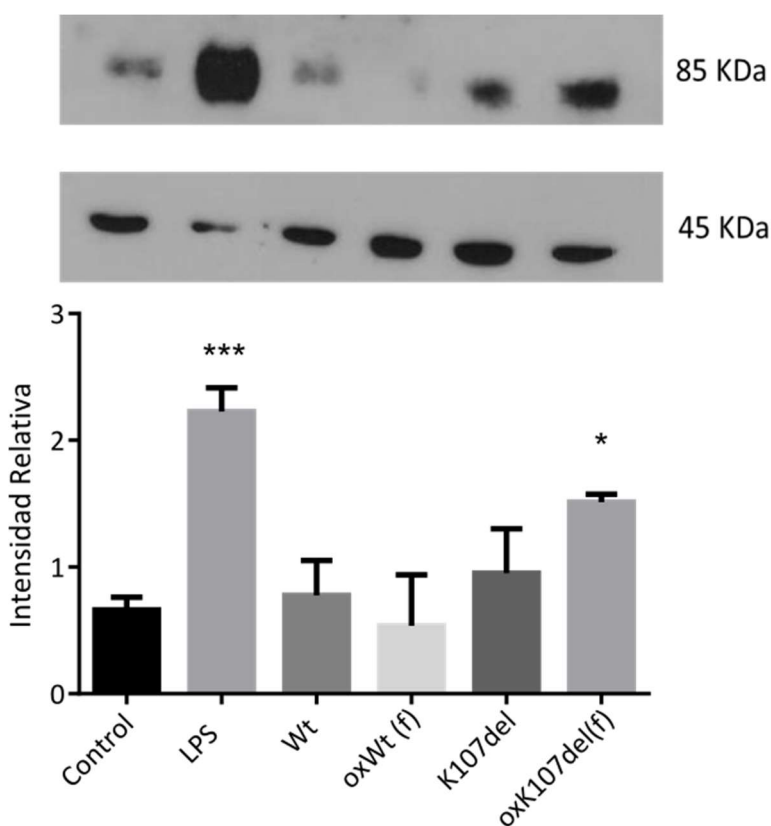


Figura 4.6. Cuantificación de la expresión relativa de ICAM-I en células endoteliales luego de ser incubadas con apoA-I Wt y K107del solubles y fibrilares. Las células HMEC-I fueron incubadas por 24h con 1µg/ml de las variantes proteicas en estudio. Luego se levantó la monocapa mecánicamente, se lisaron las células y se realizó el ensayo de Western Blot para detectar la expresión de ICAM-I (panel superior, 85 kDa) relativo al control de carga (β-actina, panel superior 45 kDa). *representa diferencias significativas de $p < 0.05$.

Con el fin de analizar la morfología celular endotelial luego de los tratamientos, sometimos a las monocapas celulares a un análisis microscópico. Como queda manifiesto en la Figura 4.7, pudimos observar que en los controles (células incubadas en ausencia de proteínas (A)), con LPS (B) y con variantes nativas (C y E)) se encontraban confluentes y con un fenotipo normal de células endoteliales que crecen monocapa con una morfología de tipo “mosaico”. En cambio, las proteínas fibrilares alteraron la morfología de la monocapa.

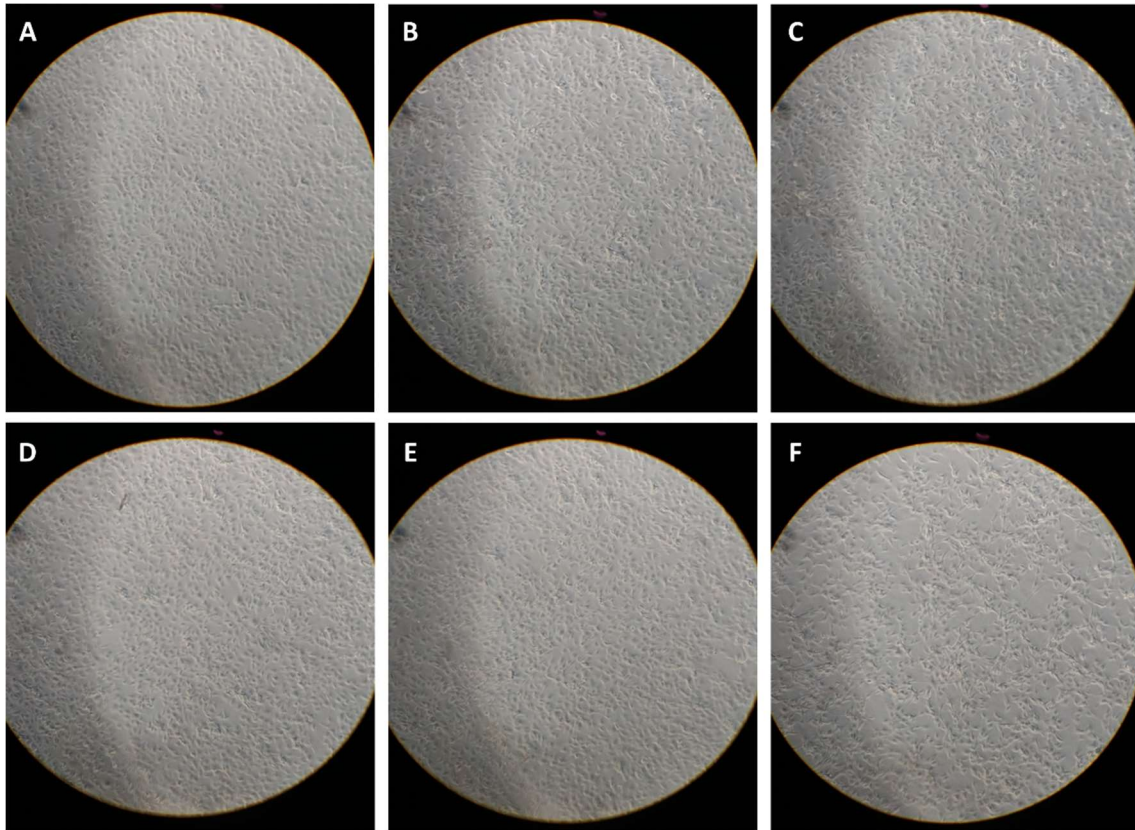


Figura 4.7. Imágenes de microscopía óptica (10X) de la monocapa de HMEC-I luego del tratamiento. Las células HMEC-I fueron incubadas por 24h con 1µg/ml de las variantes proteicas en estudio. Las mismas corresponden a el control (A), incubación con LPS (B), Wt (C), oxWt(f) (D), K107del (E) y oxK107del(f) (F).

Llamativamente, los tratamientos con oxWt(f) (D) y oxK107del(f) (F), indujeron en las células un fenotipo más ahusado, con mayor espacio intercelular, pareciendo más marcado en el caso de oxK107del(f). Si bien esta observación *per se* no es concluyente, podría sugerir un indicio de estar ocurriendo un proceso angiogénico, manifestado por la disposición de células a modo de capilar delimitando un espacio central (Ungvari y col. 2018). Esto se observa en más detalle con mayor amplificación en la Figura 4.8.

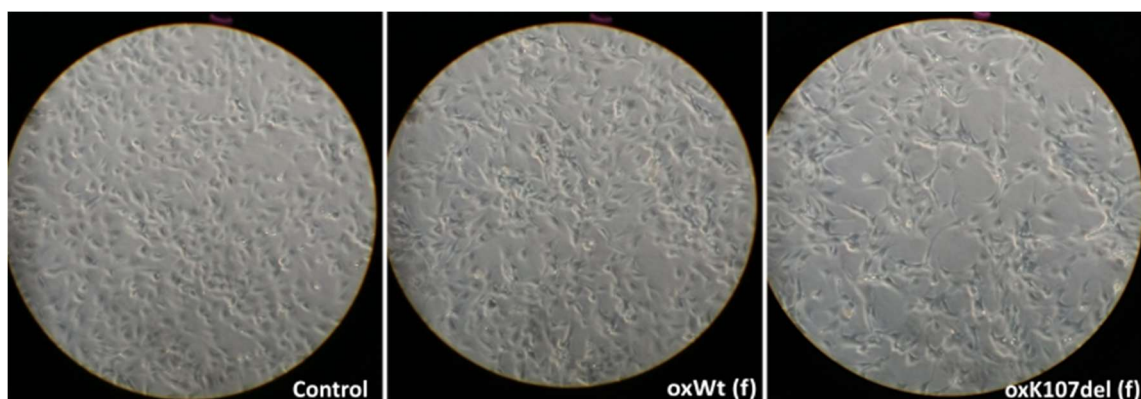


Figura 4.8. Imágenes de microscopía óptica (20X) de la monocapa de HMEC-I luego del tratamiento. Las células HMEC-I fueron incubadas por 24hs con $1\mu\text{g}/\text{ml}$ de las variantes proteicas en estudio. Las mismas corresponden a el control, incubación con oxWt(f) y oxK107del(f).

4. 5. 4 Inducción de NETosis por estructuras apoA-I

Para responder si las fibrillas amiloides podrían desencadenar la liberación de NETs *in vitro*, incubamos especies solubles y fibrilares con neutrófilos humanos. La Figura 4.9.A muestra imágenes representativas de neutrófilos incubados en diferentes condiciones. El control negativo de neutrófilos no estimulados mostró células con núcleo celular lobulado teñido en rojo y el ADN celular sin colocalización con NE (panel superior izquierdo en la Figura 4.9.A). Por otro lado, los controles positivos obtenidos por incubación con PMA (conocido inductor de NETs), mostraron una gran proporción de células sometidas a NETosis en las que la cromatina se descondensó y se colocó con NE (panel inferior izquierdo). Como lo indican los paneles superior central y superior derecho, las conformaciones solubles de Wt y K107del, respectivamente, no indujeron respuesta pro inflamatoria sobre los neutrófilos. En cambio, las proteínas oxidadas y agregadas mostraron una NETosis significativa.

La cuantificación de las células NETóticas mostró una activación más eficiente promovida por oxK107del(f) en comparación con las otras proteínas, (cuantificación en la Figura 4.9.B). Además, y de manera interesante, la incubación a largo plazo (4 h) con oxK107del(f) resultó en la formación de grandes acúmulos extracelulares, mostrado en mayor aumento en la Figura 4.9.C.

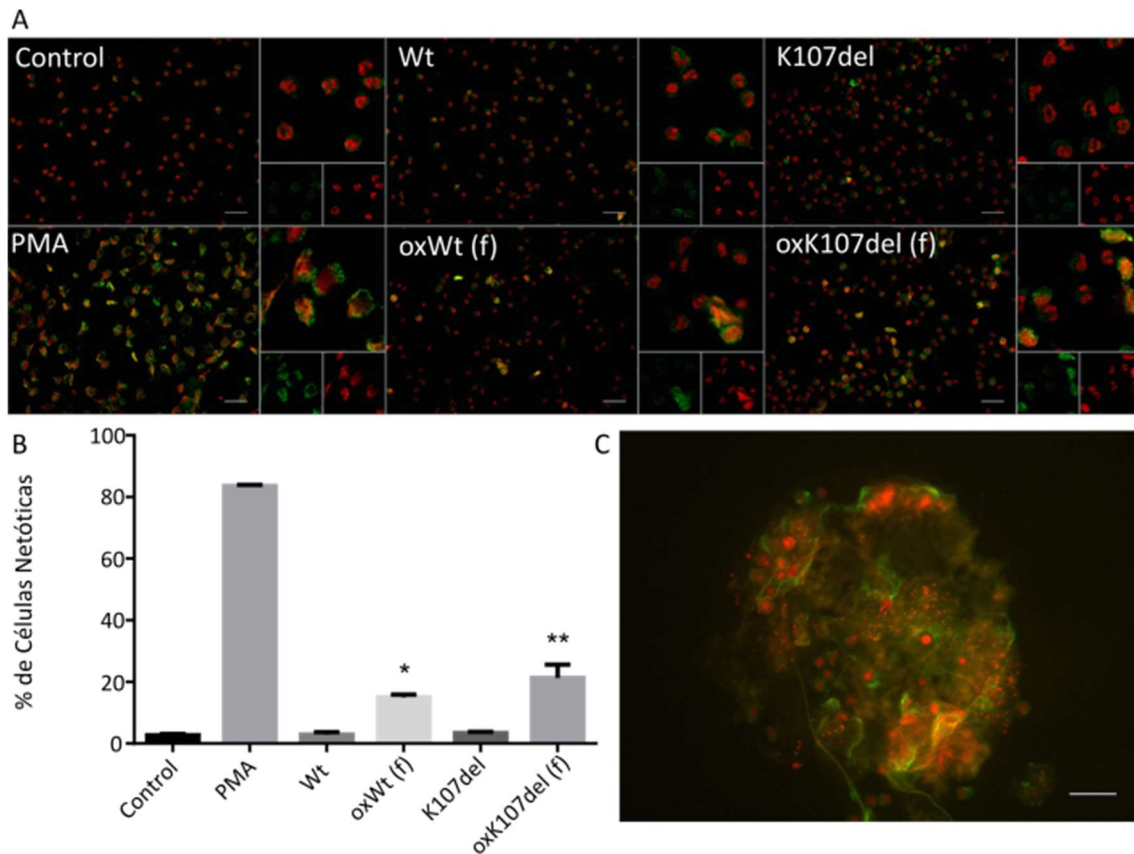


Figura 4.9. Inducción de la liberación de NETs mediada por variantes de apoA-I. A) Microscopía de fluorescencia confocal de neutrófilos incubados durante 3 h a 37 °C con 14 μ M de apoA-I Wt y K107del solubles, o las mismas proteínas oxidadas después de 30 días de incubación (oxWt(f) y oxK107del(f)). Los neutrófilos incubados con o sin 20 nM de PMA se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente. Los paneles de la derecha de cada figura muestran una amplificación (superior) de la colocalización de elastasa (fluorescencia verde inferior izquierda) y el núcleo fluorescente rojo (inferior derecha). Los experimentos se llevaron a cabo en tres réplicas biológicas y tres ensayos diferentes. (B) Cuantificación del ADN extracelular. Las barras representan el porcentaje de neutrófilos que se sometieron a NETosis. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos con neutrófilos de diferentes donantes. * indica un valor de $P < 0.05$ o ** valor de $P < 0.01$ para la comparación con los resultados de neutrófilos incubados con medio solo analizado por las pruebas de comparaciones múltiples de ANOVA y Tukey. C) Imagen obtenida con tiempos de incubación más largos (4 h) de oxK107del(f) en las mismas condiciones.

4. 6 Discusión

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis obtuvimos conclusiones parciales de la estabilidad marginal de apoA-I y del impacto de las modificaciones postraduccionales en la desestabilización, inicio de la agregación y formación de fibras maduras en apoA-I.

Sin embargo, desconocíamos si estas estructuras eran capaces de generar una respuesta citotóxica o inflamatoria en un entorno celular, perpetuando la lesión amiloide o la formación de la placa aterosclerótica.

Resultados previos del grupo avalan el concepto de que la proteína con la secuencia nativa es vulnerable al medio ambiente, especialmente en la conformación libre o pobremente lipidizada (Ramella y col. 2011). En un ambiente pro inflamatorio crónico, como es el de la aterosclerosis, es esperable que la proteína pueda sufrir PTM que generen una pérdida de función y la hagan más susceptible a agregarse como hemos demostrado aquí. Además, la presencia de estructuras fibrilares amiloides maduras en placas ateroscleróticas, conjuntamente con la aterosclerosis severa que desarrollan los pacientes portadores de la variante K107del, conduce a pensar la hipótesis del “huevo o la gallina”: ¿podrá la conformación fibrilar de apoA-I (cuya génesis es favorecida por procesos oxidativos crónicos) inducir *per se* un cuadro pro-inflamatorio y éste a su vez retroalimentar el procesamiento citotóxico de la proteína? A partir de las estructuras fibrilares obtenidas y caracterizadas biofísicamente en profundidad en los capítulos anteriores, abordamos nuestros estudios integrando el análisis desde varios modelos celulares *in vitro*.

El establecimiento de una respuesta inflamatoria no es un evento único y aislado en nuestro organismo, sino que coexisten una vasta cantidad de señales celulares que se integran. Por ello nos pareció fundamental evaluar de manera independiente, en una primera aproximación, la respuesta celular en modelos de origen humano, utilizando una línea de endotelial microvascular, macrófagos diferenciados desde monocitos y neutrófilos aislados de donantes sanos.

Utilizamos un sistema ampliamente caracterizado y usado en nuestro grupo y en otros: evaluamos la liberación de interleuquinas inflamatorias por parte de una línea celular de monocitos (THP-1) previamente diferenciados a macrófagos. Como pudimos observar, luego de la incubación de los macrófagos con las proteínas solubles y fibrilares, no vimos un aumento en la liberación de TNF α o IL-1 β (Figura 4.1). Concluimos que las proteínas *per se* no son capaces de generar una respuesta inflamatoria en el tiempo de incubación.

Las células endoteliales tienen un rol crítico en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Galley y Webster 2004). Los detalles de la forma en que las células endoteliales participan en estos procesos aún no se comprenden en su totalidad. A través de nuestro modelo de estudio con la línea celular HMEC-1, evaluamos si la apoA-I era capaz de afectar su comportamiento fisiológico. De manera altamente interesante, y por primera vez reportado, a pesar de no afectar drásticamente la viabilidad (Figura 4.5), la incubación por 24 h con las proteínas fibrilares previamente oxidadas aumentaba

significativamente la expresión de moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-I) (Figura 4.6). Podría proponerse que la expresión de factores de adhesión estimulados por oxK107del(f) resultará en un reclutamiento de células del sistema inmune, actuando como un “disparador” de la respuesta pro-inflamatoria.

ICAM-1 o CD54 es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) y es fundamental para la detención firme y la transmigración de leucocitos fuera de los vasos sanguíneos y hacia los tejidos. Está presente de manera constitutiva en las células endoteliales, pero su expresión se ve aumentada en procesos inflamatorios y en la placa aterosclerótica. Se ha medido una forma circulante o soluble de ICAM-1 (sICAM-1) en varios fluidos corporales, observándose niveles elevados en pacientes con aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, enfermedad de las arterias coronarias y vasculopatía de trasplante (Lawson y Wolf 2009). La activación de ICAM-1 en la superficie de células endoteliales, conduce a la activación de varias cascadas de señalización proinflamatoria y al reordenamiento del citoesqueleto de actina. Algunos estudios revelan además, un efecto angiogénico de la molécula ICAM-1 (Deng y col. 2007).

A través de las imágenes de microscopía óptica que obtuvimos durante los ensayos realizados, pudimos analizar que la incubación del endotelio con las proteínas fibrilares presentaba un fenotipo diferente al control (Figuras 4.7 y 4.8). Si bien sería clave determinar la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para tener mayor certeza, la observación microscópica sugiere fuertemente la ocurrencia de angiogénesis en esta condición. La angiogénesis es el proceso por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de células sanguíneas preexistentes a través del "brote" de células endoteliales, expandiendo así el árbol vascular (Carmeliet 2000; Rajabi y Mousa 2017). El estado inflamatorio local que ocurre en las lesiones ateroscleróticas puede desempeñar un papel en la angiogénesis a través de varios mecanismos, como la activación de las células endoteliales, la liberación de citoquinas, factores de crecimiento, mediadores de lípidos, proteasas y aumento de la tasa metabólica endotelial (Camaré y col. 2017). Un mecanismo interesante que podría intervenir en la angiogénesis (y dado el rol de la apoA-I en el TRC) es mediante la regulación del contenido de colesterol de las membranas.

Las HDL ejercen innumerables mecanismos que promueven la función y mantenimiento endotelial y una de esas funciones clave e interesante de mencionar es la angiogénesis. La proteína unidora de apoA-I (AIBP) es una proteína secretada que se une a HDL y facilita la remoción de colesterol de las células a través de su interacción con la proteína transportadora ABCG1. La sobreexpresión de AIBP conduce a la disminución del colesterol de las células endoteliales y reduce los “lipid rafts” en la membrana celular. Este efecto interfiere en la dimerización del VEGF2, lo que inhibe la angiogénesis. Así,

un nivel alto de colesterol en la membrana favorece la expresión del VEGF2 y aumenta la angiogénesis, función clave para la inhibición de la aterogénesis. En cambio, un nivel bajo de colesterol (como ocurre en células en alta tasa de división) inhibe dicho proceso (Lyu, Yang, y Shim 2019). Este ingenioso sistema permite a las HDL ejercer un efecto beneficioso regulando de manera inversa dos patologías desbastadoras como la aterosclerosis y el cáncer. En estudios previos del grupo se demostró que la apoA-I Wt oxidada fue menos eficiente para remover colesterol de un modelo celular (Ramella y col. 2011). En nuestro sistema podría proponerse que la conformación de proteínas oxidadas y fibrilizadas, especialmente la variante K107, sean ineficientes en la remoción de colesterol, promoviendo entonces el fenotipo pro-angiogénico observado en este trabajo (Fig 4.8). Nuestros resultados parciales enfocan los estudios futuros sobre la relación entre el efecto de las estructuras fibrilares de apoA-I y su capacidad de alterar el fenotipo del endotelio microvascular hacia un proceso angiogénico. Estamos trabajando en la posibilidad de cuantificar la producción del factor de crecimiento endotelial vascular por parte de las células endoteliales (VEGF), clave en este proceso, y en la producción de metaloproteasas que pueden degradar la matriz extracelular, facilitando así la migración celular. Las hipótesis que se plantean a partir de nuestras conclusiones preliminares serán testeadas en los próximos estudios del grupo.

Otros participantes de la inmunidad innata que nos pareció un modelo importante a evaluar fueron los neutrófilos. Evaluamos la capacidad de las proteínas en generar la liberación de NET en un modelo de neutrófilos humanos. Las NET consisten en cromatina extracelular decorada con proteínas granulares y citoplasmáticas, como la MPO y la elastasa. Los neutrófilos se encuentran entre las células que se reclutan en los sitios de inflamación para matar bacterias u otros agentes infecciosos. Sin embargo, la inflamación estéril es provocada por moléculas endógenas que actúan como señales para atraer a las células inmunes innatas hacia la lesión. La formación de NET se ha descrito en diversas enfermedades (Döring, Soehnlein, y Weber 2014), incluida la trombosis asociada a infecciones, vasculitis de vasos pequeños, lupus eritematoso sistémico (LES), e inflamación de la piel y en la enfermedad de Alzheimer (Moschonas y Tselepis 2019). Además, se encontraron NET derivados de neutrófilos en lesiones ateroscleróticas (de Boer y col. 2013; Megens y col. 2012) y en depósitos de amiloide de pacientes con diferentes amiloidosis sistémicas (Stone y col. 1993).

En conjunto, nuestros hallazgos respaldan que una conformación de proteínas mal plegada podría comenzar o alimentar una inflamación innata. Demostramos que la conformación fibrilar de oxK107del(f) (y en menor grado agregados fibrilares de Wt) es más eficiente para activar células inmunes como neutrófilos e induce NETosis (Figura

4.9). En apoyo de este hecho, existen otros estudios *in vitro* que han demostrado la formación de NET a partir de la sinucleína fibrilar (Azevedo y col. 2012).

Las trampas extracelulares de neutrófilos podrían percibirse como “un arma de doble filo” en el contexto de los procesos patológicos, ya que puede atenuar la lesión tisular y amplificar la inflamación local, lo que conduce a un deterioro en síntomas de la enfermedad (Jorch y Kubes 2017). La presencia de NET se ha asociado con deterioro endotelial y tisular, y contribuyen al ambiente pro-aterogénico. Este efecto se puede atribuir a las diversas proteasas que albergan las NET, así como a la actividad citotóxica de las histonas (Moschonas y Tselepis 2019). Se propuso que la oxidación de apoA-I mediada por MPO puede estar implicada en el mecanismo que tiende a un fenotipo amiloidogénico y su deposición en placas ateroscleróticas *in vivo* (Chan y col. 2015; Wong y col. 2010). Además, es importante destacar que la formación de NET se asocia con un fenotipo de macrófagos pro-inflamatorios, es decir, la interacción NET-macróforo es un factor que probablemente contribuya a la inflamación persistente ya que inducen un fenotipo celular proinflamatorio "similar a M1" (Josefs y col. 2020). Considerando que en nuestros ensayos no observamos la activación de los macrófagos por parte de las proteínas, pero sí la liberación de NETs, podríamos plantear la hipótesis de que es necesaria la activación de neutrófilos para que se inicie el evento NETótico que activará luego a los macrófagos.

En suma, los macrófagos tisulares fomentan el crecimiento, la remodelación o la regresión de los vasos. Su actividad proangiogénica está mediada por varios TLR que actúan en sinergia con los receptores de adenosina A_{2A} que regulan positivamente la producción de VEGF, pero algunos ligandos de TLR, como LPS, estimulan directamente a las células endoteliales (Danese, Dejana, y Fiocchi 2007). Se realizarán ensayos de cocultivos con las líneas celulares disponibles para profundizar este análisis y poner a prueba nuestras hipótesis de la posible sinergia en la activación de los diferentes tipos celulares para la generación de una respuesta inflamatoria.

En resumen, aquí mostramos que las conformaciones fibrilares de apoA-I Wt y apoA-I K107del en mayor medida, provocan drásticamente la activación de células claves involucradas en un escenario pro-inflamatorio. Se podría plantear la hipótesis de que la génesis de las fibras está dada en un escenario inflamatorio, donde los neutrófilos o macrófagos activados (ya sea de una lesión previa o inducidos por las conformaciones patológicas) liberan MPO que oxida a las proteínas favoreciendo la formación de variantes amiloides fibrilares. El endotelio juega un rol clave en este proceso al ser activado por estas estructuras, reclutando células del sistema inmunológico innato, incluidos los neutrófilos, que han surgido como importantes contribuyentes a la aterosclerosis. Estos mecanismos pueden resultar en una retroalimentación de

respuestas pro-inflamatorias que perpetúan la lesión y explican la estrecha asociación entre la amiloidosis, la inflamación y la aterosclerosis.

Capítulo 5:

Discusión general y perspectivas futuras.

Durante este trabajo de tesis obtuvimos importantes conclusiones acerca del mecanismo pro-amiloidogénico de apoA-I que nos permitieron confirmar la estrecha asociación entre la amiloidosis y la inflamación. Más aún, nos abrió las puertas a un mundo de incógnitas. Quedan muchísimas preguntas por resolver y trabajo a desarrollar.

A fin de entender parámetros inherentes a la proteína que apoyaran su tendencia al plegamiento anómalo, primera hipótesis de esta tesis, enfrentamos un abordaje bioinformático que nos permitió el análisis de sus características evolutivas, dinámicas y estructurales. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la APR1 es necesaria para asegurar la estabilidad marginal del haz de hélice α de apoA-I, aunque esta región podría desencadenar la agregación tras la exposición al solvente o la escisión proteolítica (Arciello, Piccoli, y Monti 2016). En base a esto, surgieron nuevos interrogantes acerca del rol de estas regiones propensas a la agregación, y que el grupo está resolviendo en simultáneo: se plantearon ensayos *in vitro* a desarrollar con el péptido sintético de la APR1 con el fin de profundizar aún más nuestros conocimientos.

Las mutaciones descritas como amiloidogénicas no tendrían *per se* un efecto general de aumentar la tendencia amiloide de las secuencias APR previamente establecidas. Sin embargo, dichas mutaciones amiloides naturales descritas inducirían una mayor desestabilización que el resto de las variantes naturales. Esto evidencia un vínculo estrecho entre la desestabilización estructural de la conformación nativa de apoA-I y la aparición de patología amiloide. Dado que la mayoría de las sustituciones inducen solo ligera modificación de la energía libre, esto indicaría que debería haber quizá eventos sumatorios para inducir el colapso estructural de la proteína. De manera interesante, la región N terminal (donde ocurre gran parte de las mutaciones amiloides), no sólo muestra un mayor grado de desestabilización frente a mutaciones, sino que se predice que esa inestabilidad se asocia a patogenicidad (Figuras 2.5 y 2.6)

El despliegue del haz de hélice y la exposición de las regiones de agregación parecen representar los primeros pasos de la amiloidosis mediada por apoA-I. A través de las simulaciones de dinámica molecular de la variante natural G26R pudimos afirmar que este es uno de los mecanismos posibles para la agregación de la proteína, pero no sería el único. Observamos un efecto leve sobre la estructura y en la exposición de las APR de apoA-I para las variantes L60R, K107del y R173P en nuestros tiempos de simulaciones, por lo que podrían ser necesarias modificaciones adicionales para promover la agregación de proteínas de estos mutantes. Coincidimos con otros autores de que la propensión a la agregación *per se* provocada por las mutaciones puntuales tiene un impacto limitado en el proceso de agregación de apoA-I de longitud completa y se requieren ciertos factores desestabilizadores para desencadenar el inicio del proceso amiloide (Raimondi y col. 2011).

Así, pudimos aceptar la primera hipótesis de este trabajo, apoyando a que existen determinantes estructurales, ya sea mutaciones naturales o efectos del microambiente, que favorezcan la exposición de regiones propensas a la agregación, que incrementan la tendencia a agregarse de apoA-I. Es interesante la observación de que NO es predecible alguna sustitución o factores inherentes a la organización estructural proteica que permitan por si solos justificar la naturaleza pro-amiloide de estas variantes naturales. La gran flexibilidad estructural de la proteína (previamente consensuada por diversas líneas experimentales y apoyada por nuestras predicciones), sugiere que las mutaciones naturales serían un factor que pueda alterar ligeramente el marco energético de plegamiento favoreciendo un equilibrio hacia una conformación anómala. Sin embargo, sería necesaria la sinergia con otras modificaciones estructurales postraduccionales para que resulte en una conformación proteica insoluble. Tener en cuenta esta aseveración, podría explicar, al menos en parte, por qué la incidencia de la patología ocurre en estadios crónicos en la vida de pacientes, y con disímil manifestación aún dentro de familias portadoras de una mutación.

En búsqueda de probables contribuciones locales, y en base a las conclusiones de esta primera parte de nuestro trabajo, planteamos la hipótesis de que las modificaciones postraduccionales alteran la estructura de apoA-I y favorecerían la exposición de un precursor proamiloidogénico a partir de la proteína libre de lípidos. Surgió un particular interés en caracterizar profundamente la conexión entre el microambiente proinflamatorio y la formación de especies propensas a la agregación, bajo la hipótesis de que episodios crónicos leves inducirían el despliegue de proteínas.

Para comprender los eventos que determinan el fracaso de apoA-I para cumplir su función protectora, y desplazarla hacia un perfil pro-amiloidogénico y pro-aterosclerótico, llevamos a cabo un estudio comparativo entre la proteína Wt y una variante natural con una deleción del residuo K107, que constituye un excelente modelo ya que los pacientes portadores de esta variante presentan amiloidosis y aterosclerosis severa. Las proteínas solubles no demostraron grandes diferencias, excepto un aumento en la flexibilidad estructural que ya se había reportado para apoA-I K107del. A través de la oxidación controlada de estas proteínas (como modelo de PTM de un entorno inflamatorio) pudimos obtener estructuras fibrilares definidas y polimórficas. La complejidad del sistema para inducir la estructura fibrilar en apoA-I nos induce a pensar en la posibilidad de la estructura hallada no sea el estadio final. La gran mayoría de la información recopilada sobre el polimorfismo estructural de las fibrillas de amiloide se

ha obtenido de las fibrillas formadas *in vitro* y, por lo tanto, puede que no sea directa y totalmente aplicable a los amiloides patológicos. Por lo tanto, es muy importante realizar estudios comparables de polimorfismo amiloide en fibrillas obtenidas directamente de muestras *in vivo* (Adamcik y Mezzenga 2018).

En base a estos resultados, podemos contestar la hipótesis que interacciones o reacciones químicas que pueda experimentar la proteína en circulación, especialmente debidas a un ambiente pro-oxidante, pueden contribuir a incrementar la génesis de una estructura precursora de agregados amiloides de manera crónica que sean proclives a depositarse. Podemos expandir la hipótesis, además, indicando que la variante amiloidogénica es más susceptible, no solo a la agregación de la proteína recién sintetizada como comentamos arriba, sino al procesamiento del microambiente.

Un gran campo de investigación tradicional abocado a explicar la patogenicidad de proteínas amiloides, indicaba como citotóxica a la conformación fibrilar hallada en las lesiones (Glennner et al. 1984). Sin embargo, trabajos más recientes, especialmente conocido para la enfermedad de Alzheimer inducida por el péptido A β 1-42, propone que conformaciones proteicas más difusibles (oligómeros en ese caso), podrían tener más participación en el establecimiento del cuadro (Walsh y Selkoe 2007). Sin dudas el evento podría ser complejo, y fue planteado también que conformaciones fibrilares de proteínas amiloides aumentan la patogenicidad al ser proteolizadas por elastasa (Azevedo et al. 2012). Como es esperable, este campo es absolutamente inexplorado para la amiloidosis mediada por apoA-I. Con la hipótesis que estas estructuras fibrilares no son pasivas, sino que pueden a su vez iniciar una respuesta local en el escenario celular con el que interactúa, nos propusimos estimar la contribución de las distintas conformaciones sobre la estimulación del sistema inmune. Describimos la estructura de la conformación fibrilar obtenida a partir de la oxidación de las variantes proteicas, y demostramos que la conformación fibrilar de oxK107del provoca drásticamente la activación de neutrófilos, células claves involucradas en un escenario pro inflamatorio. En suma, observamos la activación del endotelio, lo que nos lleva a la conclusión de que el proceso es aún más complejo y son necesarios estudios más profundos que impliquen la evaluación de posibles vías de activación, la confirmación de la inducción del endotelio hacia un proceso angiogénico, y cocultivos que nos permitan evaluar la retroalimentación o la generación de nuevas respuestas pro-inflamatorias. Es clave profundizar el rol de los macrófagos en este escenario que no son activados directamente por las estructuras evaluadas, pero sí podrían hacerlo a través de otro mecanismo, como cross-talk celular con los neutrófilos o el endotelio activado.

Las redes de neutrófilos pueden desempeñar un papel importante en la promoción de la aterosclerosis, la trombosis y otras complicaciones vasculares (Gupta y col. 2010) y al parecer en la amiloidosis por apoA-I. El repertorio provocado cuando los neutrófilos se activan contribuye a establecer un entorno inflamatorio y pro-aterogénico. La mieloperoxidasa, por ejemplo, abundantemente expresada y almacenada dentro de los gránulos primarios facilita la formación de especies reactivas de oxígeno, que pueden inducir la oxidación de diferentes sustratos, como lípidos y proteínas, lo que da como resultado una disfunción endotelial. En este entorno, la apoA-I sería propensa a oxidarse y podría resultar en una conformación menos funcional, pero también podría ayudar en el asentamiento de la lesión crónica.

Mediante este diseño experimental y analítico, podemos contestar la hipótesis que existe una retroalimentación entre especies mal plegadas y el microambiente, donde el procesamiento inducido a la proteína actúa a su vez incrementando la lesión. Es necesario el estudio comparativo con alguna variante amiloidogénica de apoA-I que no esté involucrada en aterosclerosis. De esta manera, lograremos saber si el mecanismo de NETosis es único para apoA-I Wt y K107del lo que podría explicar la génesis de la patología de manera global. También creemos fundamental evaluar si la liberación de NET por apoA-I es dependiente de NADPH oxidasa, mecanismo que comparten otras fibras amiloides (Azevedo y col. 2012).

En síntesis, las amiloidosis asociadas a apoA-I parecen depender de un proceso inflamatorio preexistente. Las fibras de oxK107del podrían inducir amiloidosis o aterosclerosis al inducir inflamación local en los vasos diana. Esto apoya la retroalimentación propuesta entre conformaciones anómalas generadas crónicamente (proporcionada por la tendencia a la agregación y la convivencia de factores locales), y la estimulación de estas especies sobre el microambiente, agravando la lesión. Podría ser esperable distintos grados de participación de conformaciones proteicas protagonistas de estos eventos. Entre otros pueden evaluarse péptidos liberados por proteasas específicas, que puedan actuar como agentes nucleantes de agregación. También es importante considerar la interacción entre estructuras monoméricas, oligoméricas y fibrilares con componentes de la matriz extracelular. Además de ello, los eventos celulares participantes, las vías de señalización involucradas y la razón de la órgano-especificidad de esta patología, ofrecen un campo a profundizar a fin de entender la amiloidosis por apoA-I, sin dudas subdiagnosticada en nuestro medio.

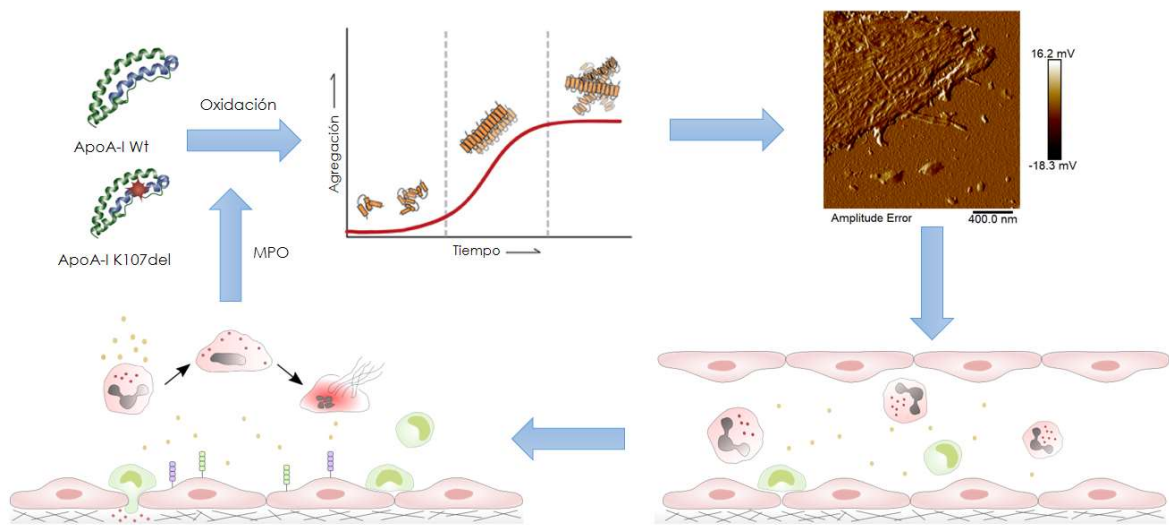


Figura 6.1. Representación esquemática de los resultados obtenidos durante el trabajo de tesis. Se muestra una representación esquemática que propone el “diálogo” entre estructuras proteicas anómalas favorecidas por el microambiente y la retroalimentación pro-inflamatoria de estas especies sobre los protagonistas del sistema inmune.

6. Anexo

Fundamentos y métodos generales.

Entrecruzado (“crosslinking”) de proteínas.

Las reacciones de reticulación química o entrecruzamiento forman enlaces covalentes entre diferentes moléculas (intermolecular) o dentro de partes de una molécula (intramolecular) (Sinz 2006). Se ha aplicado al estudio de los efectos de la unión del ligando y los cambios conformacionales asociados con la agregación de proteínas en solución (Schmidt y Robinson 2014). Para esta aplicación, la base de la reticulación química, implica el enlace covalente de dos grupos reactivos de cadenas laterales de aminoácidos, ubicados a una distancia próxima y específica, utilizando reactivos químicos bifuncionales (Schmidt y Robinson 2014). La ubicación de los enlaces cruzados creados impone una restricción de distancia en la ubicación de las respectivas cadenas laterales y permite sacar conclusiones sobre la estructura tridimensional de la proteína o un complejo proteico. Recientemente, la reticulación química de proteínas se ha combinado con un análisis espectrométrico de masas de los productos reticulados.

Existen cientos de reactivos descritos en la literatura u ofrecidos comercialmente, que se basan en un pequeño número de reacciones químicas orgánicas. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) son reticulantes reactivos a aminas, probablemente el principio más ampliamente aplicado para crear reactivos acilantes. Se introdujeron como reactivos de reticulación homobifuncionales, altamente reactivos con aminas. Debido a que muchos ésteres de NHS son insolubles en tampones acuosos, la mayoría de los protocolos implican disolver el éster de NHS en un disolvente orgánico a alta concentración y diluir esa solución madre en el medio de reacción. Alternativamente, se utilizan ésteres de sulfo-NHS, los análogos solubles en agua. Los ésteres de NHS reaccionan con nucleófilos para liberar el grupo NHS o sulfo-NHS y crear enlaces amida e imida estables con aminas primarias o secundarias, como los grupos N-terminal y ϵ -amino libres en las cadenas laterales de lisina de proteínas (Figura 6.1).

Para llevar a cabo los ensayos utilizamos bis-sulfosuccinimidil suberato (BS3), un éster de NHS soluble en agua ampliamente utilizado en ensayos de reticulación de apoA-I (algo de uso en apo). Reacciona eficazmente con grupos amino primarios ($-NH_2$) en tampones de pH 7 a 9 para formar enlaces amida estables. La reacción da como resultado la liberación de N-hidroxisuccinimida. Las apoA-I tiene varias aminas primarias en la cadena lateral de los residuos de lisina (K) y, también, presente en el extremo N, que están disponibles como dianas para los reactivos éster NHS.

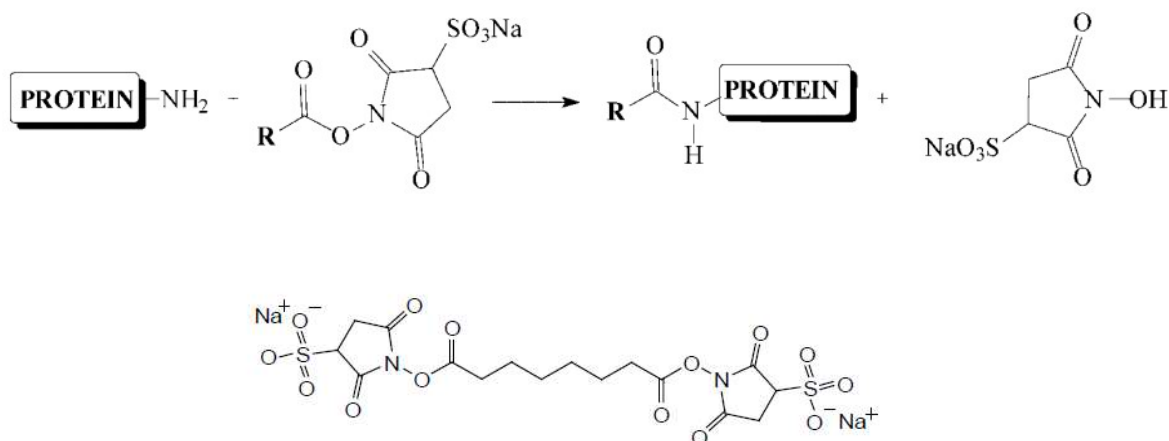


Figura 6.1. Esquema de la formación de un enlace amida (panel superior). Molécula de BS3 (bis [sulfosuccinimidil] suberato) en el panel inferior.

Ensayos de fluorescencia.

La luminiscencia es la emisión de fotones desde estados electrónicamente excitados. La fluorescencia es la emisión que resulta del regreso de un electrón apareado a su nivel basal. Las moléculas con capacidad fluorescente, poseen por lo general electrones deslocalizados, típicamente en dobles enlaces conjugados.

El proceso de fluorescencia puede ser ilustrado de manera simplificada por el diagrama de Jablonski (Figura 6.2). Los niveles electrónicos basal, primer y segundo están representados por S_0 , S_1 y S_2 , respectivamente. En cada uno de estos niveles energéticos los fluoróforos pueden existir en distintos niveles vibracionales, mostrados como 0, 1, 2, etc. En este diagrama se excluyen un número de interacciones que pueden ocurrir en el estado excitado, como por ejemplo apagado, transferencia de energía e interacción con solventes. Un fluoróforo puede ser excitado a niveles vibracionales superiores de S_1 o también a S_2 . Salvo por excepciones, las moléculas suelen relajarse rápidamente a los niveles vibracionales inferiores de S_1 . Este proceso se llama interconversión interna y ocurre en 10–12 seg. Este tiempo relativamente corto en relación a la vida media de la fluorescencia (del orden de 10⁻⁸ seg), hace que la conversión interna ocurra casi completamente previo a la emisión. Así la emisión de fluorescencia ocurre desde estados excitados térmicamente equilibrados.

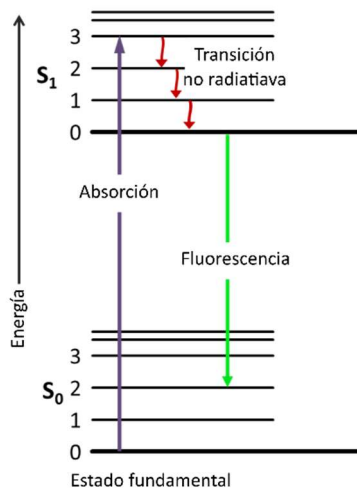


Figura 6.2 Diagrama de Jablonski

Los espectros de fluorescencia son presentados como espectros de emisión, en los cuales se determina el cambio de intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda, esta emisión dependerá de la estructura química del fluoróforo y del solvente en que se encuentre disuelto. Así tanto la intensidad como el corrimiento del máximo de emisión espectral dan información importante. La primera depende de la concentración de fluoróforo, de la interacción del mismo con su entorno, de la transferencia de energía con la misma especie o con otra, del apagado por otra especie, etc. Todo esto determinará el rendimiento cuántico, o sea la relación entre fotones absorbidos versus los emitidos. El segundo proceso es llamado corrimiento de Stokes. Excepto para átomos en fase vapor, de la observación del diagrama de Jablonski se hace evidente que la energía de emisión es típicamente menor que la de absorción, y por lo tanto la fluorescencia ocurre a mayores longitudes de onda que la excitación. Los fluoróforos pueden presentar, además, corrimientos adicionales debido a la relajación de los estados excitados ocasionados por solventes polares, o sufrir reacciones químicas durante el estado excitado.

A fin de estudiar una estructura proteica pueden utilizarse fluoróforos sintéticos (fluoresceína, bis-ANS, etc.), o utilizar la capacidad de fluorescencia intrínseca, la que se origina de los aminoácidos aromáticos Tyr, Trp y Phe. El grupo indol del Trp es el que predomina cuando las proteínas absorben y emiten luz en la región del ultravioleta del espectro. La Tyr tiene una intensidad de emisión similar a la del Trp, pero su máximo de emisión está dado en longitudes de onda menores que la de éste y su fluorescencia puede ser modificada por interacciones con péptidos o aminoácidos como el Trp, además la misma aumenta en proteína desnaturalizadas, debido a cambios en el pKa del fenol

que favorecerían el estado excitado. La fluorescencia de la fenilalanina adquiere importancia cuando en proteínas no existe residuos de Trp o de Tyr, cosa que raramente ocurre. La emisión del Trp es altamente sensible al ambiente que lo rodea, sufriendo un corrimiento hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo del espectro) cuando el medio al que se expone este residuo es acuoso. A fin de facilitar la interpretación de la influencia del medio en el que una proteína se encuentra sobre su estructura, se puede definir la longitud de onda (en 295 nm) a fin de excitar casi exclusivamente a los residuos Trp (Fig. 4.3.2).

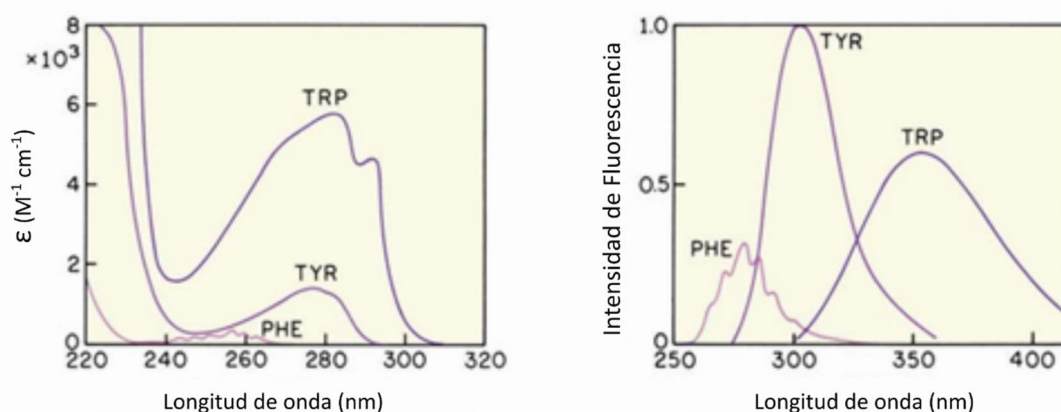


Figura 6.3. Espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) de los aminoácidos fluorescentes en agua a pH 7.0.

Utilización de sondas:

Fluorescencia de ANS y bis-ANS.

Para monitorear la exposición de bolsillos hidrofóbicos en la apoA-I Wt y sus variantes, se utilizó la sonda ANS y bis-ANS (Munishkina y Fink 2007). Estas sondas son moléculas fluorescentes sensibles al ambiente cuyo rendimiento cuántico es muy bajo en solución acuosa, pero aumenta fuertemente cuando se une a superficies hidrofóbicas en las proteínas. Esta unión es especialmente eficiente en proteínas parcialmente desplegadas (Martins, Chapeaurouge, y Ferreira 2003).

ANS y Bis-ANS, el análogo dimérico de ANS, exhiben propiedades de fluorescencia intrínseca similares. El tamaño diferente de ANS y Bis-ANS puede conducir a diferencias en las afinidades de unión y el número de sitios de unión en proteínas (Hawe, Sutter, y Jiskoot 2008).

Las soluciones de es ambas sondas se prepararon en metanol de calidad analítica en una concentración final de 1 mM. La fluorescencia se determinó en un lector de placas (Beckman DTX 880) y se usaron microplacas opacas con fondo óptico (Nunc 96 wells black optical botton).

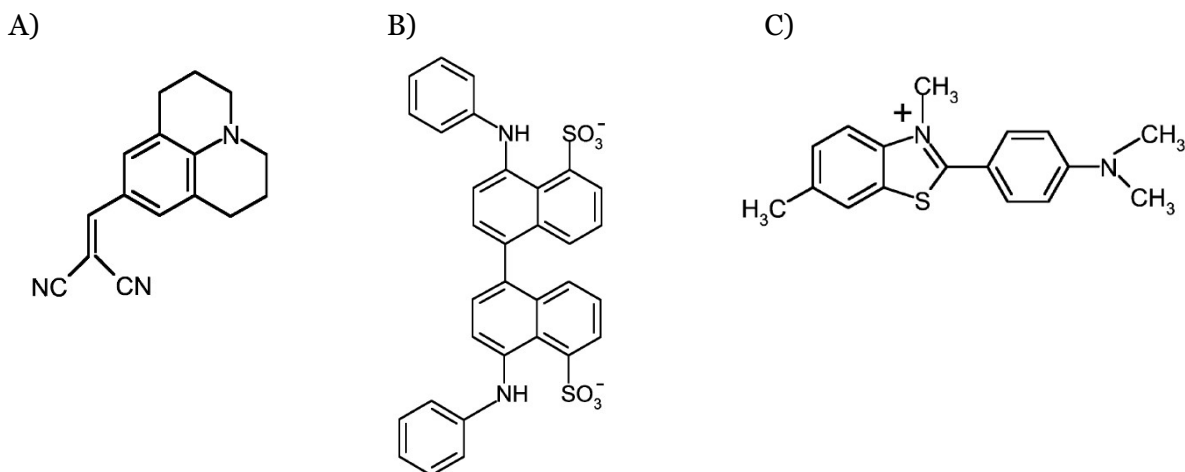


Figura 6.4. Estructuras químicas de sondas fluorescentes de uso común: ANS (A), Bis-ANS (B), Tioflavina T (C).

Agregación de proteínas seguida por fluorescencia de tioflavina-T (ThT).

Los máximos de absorción de tioflavina T (ThT) se ven afectados por la polaridad del disolvente y su rendimiento cuántico, se ve afectado por la viscosidad del disolvente y la rigidez del microambiente (Hawe, Sutter, y Jiskoot 2008). Originalmente, ThT se ha utilizado como colorante histoquímico para teñir depósitos de tipo amiloide en tejidos (Kelényi 1967) y más tarde para la cuantificación de fibrillas de amiloide *in vitro* en presencia de proteínas precursoras de amiloide y agregados amorfos (LeVine 1999).

Las láminas beta cruzadas son la estructura secundaria predominante de las fibrillas amiloides. En presencia de amiloides, la ThT exhibe un pico de absorción adicional a 450 nm y se vuelve altamente fluorescente con un máximo de emisión a 480 nm. Varios grupos propusieron mecanismos para estas interacciones. Se ha propuesto que la ThT interactúa con las estructuras de láminas β , ya que son un elemento estructural predominante en las fibrillas de amiloide (Levine III 1993). Sin embargo, la unión de la ThT no está estrictamente vinculada a las estructuras de la hoja β , ya que la fluorescencia puede ser inducida por cavidades que no son de la hoja beta, por ejemplo, en acetilcolinesterasa o γ -ciclodextrina, aunque no todas las estructuras ricas en láminas

β , p. transtiretina, induce fluorescencia (Groenning y col. 2007). Khurana y col. atribuyó el aumento de la fluorescencia en presencia de fibrillas de amiloide a la formación de micelas de ThT que se unen a los surcos de las protofibrillas o fibrillas retorcidas, analizadas por microscopía de fuerza atómica (Khurana y col. 2005). Krebs y col. sugirió un canal de aproximadamente 6,5 a 6,9 Å de ancho dentro de las láminas β de las fibrillas de amiloide, con el volumen del canal definido dependiendo de las cadenas laterales de la proteína, como sitio donde la ThT se une con su eje largo paralelo al de las fibrillas. Cuando se une al canal, la sonda permanece en una conformación plana en el estado excitado, lo que da como resultado un aumento de los rendimientos cuánticos. Dado que estas limitaciones estéricas del canal son hasta cierto punto típicas de las fibrillas amiloides, la fluorescencia de la ThT es adecuada para sondear las fibrillas amiloides (Krebs, Bromley, y Donald 2005). Las mediciones de anisotropía de fluorescencia combinadas con calorimetría de titulación isotérmica y modelado molecular revelaron que la fluorescencia se induce en mayor medida cuando la ThT se une a cavidades de 8 a 9 Å, que son capaces de albergar un dímero de Th T. Se concluyó que la restricción de la rotación molecular alrededor del enlace no es suficiente para inducir la fluorescencia, pero que probablemente una formación de excímeros dentro de la ThT dimerica conduce al aumento de la fluorescencia (Groenning y col. 2007). Las fibrillas de amiloide son agregados de proteínas filamentosas de aproximadamente 10 nm de ancho y de 0,1 a 10 μ m de longitud.

En este trabajo de tesis registramos fluorescencia empleando un lector de placas (Beckman DTX 880). El filtro de excitación utilizado fue de 430 nm, mientras que para la emisión se usó un filtro 480 nm. Se emplearon microplacas opacas de 96 wells con fondo óptico.

Microscopía.

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para las observaciones con TEM de las distintas muestras, se tomó una alícuota de cada una y se depositaron sobre las grillas durante 5 min. Luego se removió el excedente y se agregó ácido fosfotúngstico al 0.5 % durante 5 minutos para lograr una tinción negativa. Las imágenes se obtuvieron utilizando un equipo JEOL-1200 EX operando a 100 kV (Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP).

- Microscopía de fuerza atómica (AFM).

La naturaleza del AFM en la que una sonda entra en contacto físico con la muestra, hace de este instrumento una herramienta muy poderosa, puesto que además

de ser capaz de realizar imágenes de la muestra, es capaz de medir fuerzas de interacción (López y Solares 2014).

Los microscopios de barrido por sonda (SPM) se basan en detectar cambios en alguna magnitud cuando la punta recorre la superficie de la muestra a analizar, pudiéndose obtener imágenes tridimensionales a tiempo real. Las muestras estudiadas en cada caso por AFM se colocaron en mica muskovita, que fue el soporte elegido para realizar las observaciones. La muestra se dejó secar en una atmósfera saturada con N_2 , luego se lavó en dos oportunidades con H_2O desionizada para remover sales y se dejó secar nuevamente.

Todas las imágenes se obtuvieron usando un microscopio Multimode-Nanoscope (Veeco, Santa Barbara, California) operando en tapping-mode empleando una punta modelo Arrow-NCR-50 Nano World, con una frecuencia de resonancia de 258 kHz, constante de fuerza de 42 N/m y radio de la punta de 5-10 nm. Las tasas de escaneo fueron de 1- 1,5 Hz (Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA)).

Dicroísmo circular (CD)

La técnica de CD ha sido ampliamente utilizada para investigar aspectos de la conformación de péptidos y proteínas (Purdie 1996). Para que un compuesto presente señal dicroica debe ser (o contener) un cromóforo quiral, o bien, si no fuera así, por interacción con grupos vecinos el cromóforo aquiral deberá adoptar una disposición o ubicarse en un ambiente químico que induzca asimetría. Fundamentalmente utilizamos CD para (i) estimar el contenido global de estructura secundaria, (ii) detectar cambios conformacionales, y (iii) medir interacciones de ligandos (pequeñas moléculas o aún macromoléculas) o fases organizadas (por ejemplo, micelas o bicapas lipídicas) con los polipéptidos.

Para la medida de CD resulta importante distinguir dos regiones espectrales. La zona del ultravioleta lejano (UVL) (aproximadamente 180-250 nm) y la zona del ultravioleta cercano (aproximadamente 250-340 nm). El espectro de CD en la región UVL informa sobre el contenido global de estructura secundaria. La interacción entre los planos representados por los enlaces peptídicos dependerá de su disposición relativa, que será diferente (y quiral) de acuerdo con el tipo de estructura secundaria que adopte la cadena, por ejemplo, el sentido derecho de la hélice α o la casi completa inversión de los planos en una hebra β . Este hecho da origen a espectros diferentes de CD (Figura 6.5).

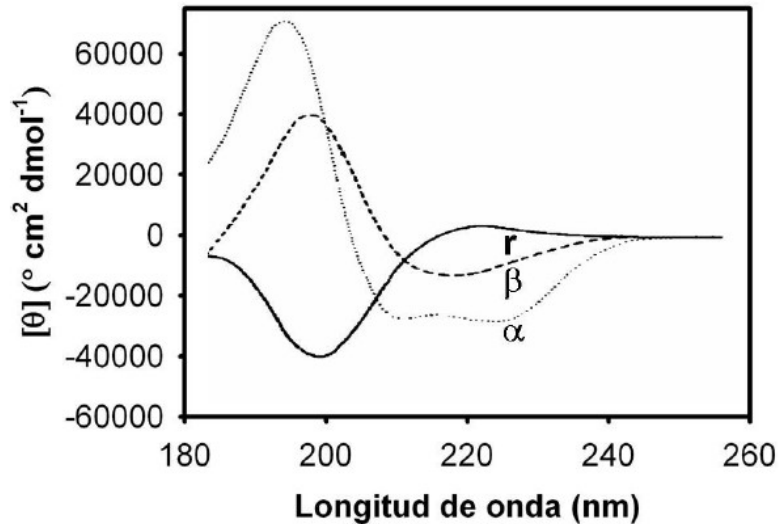


Figura 6.5. Espectros típicos para las estructuras secundarias α y β . También se muestra una cadena desordenada. Adaptado de Brahms & Brahms, 1980

Los espectros se registraron sobre diferentes disoluciones de proteínas mantenidas en buffers a una concentración mínima para evitar la interferencia de alta concentración de sal y ruido excesivo. Para la medición se utilizó un espectropolarímetro Jasco J-810 (IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA). Los datos en el UVL (200-250 nm) fueron colectados utilizando una cubeta de 1 mm de paso óptico. La velocidad de escaneo fue de 20 nm/minuto con una constante de 1 segundo de tiempo tanto para las variantes ensayadas. Cada espectro se midió al menos tres veces y los datos se promediaron para reducir al mínimo el ruido. Se calculó la elipticidad molar (Creighton 1995), utilizando un valor de peso medio por residuo para cada una de la proteínas.

Medios de Cultivo:

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB):

- 10 gr de triptona bacteriológica
- 5 gr de Extracto de levadura
- 10 gr de NaCl
- Se lleva a pH de 7.4 y a volumen de un litro, para luego esterilizar por 15 minutos a 120°C.

Medio de cultivo células THP-I

- Medio de cultivo RPMI 1640 (Gilbco Thermo Fisher Cat. Num. 23400021)
- Agua miliQ ultrapura
- 25mM HEPES
- 2g/L de Na₂HCO₃
- 10% de suero fetal bobino (SFB)
- Antibiótico/antimicótico

Medio de cultivo células HMEC-I

- Medio de cultivo MCB-D-131
- Agua miliQ ultrapura
- 10% de suero fetal bobino (SFB)
- Antibiótico/antimicótico
- Hidrocortisona
- EGFV
- Glutamina

Electroforesis de proteínas.

Los geles de poliacrilamida fueron utilizados para la determinación de pureza y pesos moleculares de proteínas y/o complejos lipoproteicos. Se utilizaron:

- Gel desnaturante (SDS-PAGE):

El sistema cuenta con dos geles contiguos, uno separador y otro resolutivo diferenciándose en las condiciones de pH, fuerza iónica y tamaño de poro, con un agente desnaturante, SDS a una concentración de 0.1% p/v. El gel resolutivo consiste en un gel continuo de concentración constante, es decir el tamaño del poro es igual a lo largo del gel, este tamaño se logra variando la concentración final de acrilamida, y como el gel de siembra. La muestra es tratada con buffer muestra que contiene SDS, β-mercaptoetanol y glicerol en buffer TRIS-HCl. Se la hierve durante 3 minutos, y se corre el gel a 120 voltios.

- Gel nativo en gradiente para proteínas (PAGE):

El método utilizado fue el de Laemmli (Laemmli 1970). Consiste en un sistema vertical discontinuo que posee dos geles contiguos. Ambos geles presentan distintas en fuerza iónica, pH y tamaño de poro. Esta discontinuidad sirve para concentrar grandes volúmenes de muestra en el gel de siembra, resultando en una mejor resolución final. El gel de siembra se preparó con una concentración final de 4% p/v de acrilamida, la cual se polimeriza resultando el tamaño de poro no limitante. El gel separador implica un gradiente lineal de concentración que va de 4% a 25% p/v en acrilamida.

El equipo usado para tal fin fue el miniVE Vertical Electrophoresis System (Amersham, GE) o MiniProtean, Bio-Rad. Las corridas se realizaron a 120 V.

- Tinción

Las proteínas se detectaron coloreando con solución de Coomassie Blue R-250, ó tinción de plata en caso de que la cantidad de proteína haya sido inferior a la detectada con la primera técnica (menor a 1 ug).

Western blot.

Esta técnica implica la detección específica de proteínas, previamente resueltas por electroforesis, mediante la utilización de anticuerpos.

Luego de corrido el gel las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham, GE). Para tal fin se empleó el equipo de transferencia semihúmedo de Bio-Rad. El buffer usado fue: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v. La transferencia se realizó a 100 v durante 1h en frío.

La membrana se bloqueó ON en solución de leche en polvo descremada al 3 % en buffer A a 4 °C. Luego de dos lavados con buffer A, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y agitación suave con el anticuerpo primario correspondiente y la dilución específica para cada caso, en buffer A con leche al 3%. A continuación, se realizaron otros dos lavados y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con enzima peroxidasa, durante 1 h. Por último, se realizaron tres lavados.

Para el revelado se preparó solución de revelado A (luminol 0,044 gr/ml en DMSO, 50 µl; ácido cumárico 0,015 gr/ml en DMSO, 22 µl; Tris-HCl 1,5 M pH 8,5, 335 µl; agua bidestilada c.s.p. 5 ml) y solución de revelado B (H₂O₂ 110 volúmenes 3,2 µl; Tris-HCl 1,5 M, pH 8,5, 335 µl; agua bidestilada c.s.p. 5 ml).

En el cuarto de revelado, se mezclaron las soluciones y se incubó la membrana con dicha mezcla durante 1 min. Posteriormente, se secó la membrana suavemente entre papeles de filtro, y se la colocó en un cassette de exposición (Kodak) con una placa

radiográfica (Kodak), dejando exponer entre 1 y 20 min, según el experimento. Luego se colocó la placa radiográfica en solución reveladora durante 1 min, o hasta la aparición de bandas. A continuación, se la retiró de la solución reveladora, se la enjuagó, y se la sumergió en solución fijadora con agitación por 1 min.

Ensayos de viabilidad celular.

La viabilidad celular puede ser determinada por varios métodos, sin embargo, los indicadores fluorescentes o cromogénicos proporcionan un método rápido y rentable para determinar cambios en la viabilidad celular. Para este trabajo de tesis utilizamos los siguientes:

- La resazurina es un colorante fluorométrico/colorimétrico que se utiliza para determinar la viabilidad mitocondrial de células vivas en un formato de alto rendimiento. Utiliza un colorante indicador (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (Abcam, ab129732), para medir las reacciones de oxidación-reducción que ocurren principalmente en las mitocondrias de las células vivas. Cuando se reduce por células metabólicamente activas, el tinte azul oscuro no fluorescente se vuelve rosa fluorescente con absorbancia a 570 nm y propiedades de fluorescencia roja ($560 \pm 10\text{Ex} / 590\text{Em}$) a pH neutro. El colorante se puede medir en modo de fluorescencia o absorbancia. Sin embargo, las mediciones en este trabajo de tesis se realizaron en modo de fluorescencia, ya que ofrece una mayor linealidad, reproducibilidad, robustez y sensibilidad del ensayo.

- El ensayo MTT, desarrollado por Mossman (Mosmann 1983), es uno de los ensayos más versátiles y mejor establecidos para determinar la viabilidad celular. El potencial redox en células de mamíferos viables provoca la conversión de MTT soluble en agua (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) en formazán insoluble. A continuación, se solubiliza el formazán y se determina la concentración de la sonda colorimétrica midiendo la DO a 570 nm. Se añadió MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL, las células se incubaron a 37 ° C durante 20 min. El precipitado (formazán) se solubilizó en dimetilsulfóxido (DMSO) después de retirar el medio y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de microplaca

Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Usamos un kit de ensayo ROS 2',7' - diacetato de diclorofluorescina (DCFDA/H₂DCFDA) (Abcam, ab113851), siguiendo las instrucciones del fabricante, para evaluar cuantitativamente las especies reactivas de oxígeno en muestras de células vivas.

DCFDA es un colorante fluorogénico que mide la actividad de hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula.

El protocolo de ensayo DCFDA se basa en la difusión de DCFDA en la célula. Luego se desacetila mediante esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, que luego es oxidado por ROS en 2', 7' - diclorofluoresceína (DCF). El DCF es altamente fluorescente y se detecta mediante espectroscopia de fluorescencia con excitación/emisión a 485 nm/535 nm utilizando un lector de microplaca.

Bibliografía

- Abraham, Mark James et al. 2015. «GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers». *SoftwareX* 1-2: 19-25. <https://doi.org/10.1016%2Fj.softx.2015.06.001>.
- Adachi, Emi et al. 2012. «Dual Role of an N-terminal Amyloidogenic Mutation in Apolipoprotein A-I». *Journal of Biological Chemistry* 288(4): 2848-56. <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.m112.428052>.
- Adamcik, Jozef, y Raffaele Mezzenga. 2018. «Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape». *Angewandte Chemie International Edition* 57(28): 8370-82. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201713416>.
- Ades, E W et al. 1992. «HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line.» *The Journal of investigative dermatology* 99(6): 683-90.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, y Osamu Takeuchi. 2006. «Pathogen Recognition and Innate Immunity.» *Cell* 124(4): 783-801.
- Amarzguioui, Mohammed et al. 1998. «Extensive intimal apolipoprotein A1-derived amyloid deposits in a patient with an apolipoprotein A1 mutation». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242(3): 534-39.
- Ansell, Benjamin J et al. 2005. «High-density lipoprotein function recent advances.» *Journal of the American College of Cardiology* 46(10): 1792-98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286161> (31 de octubre de 2012).
- Arciello, Angela, Renata Piccoli, y Daria Maria Monti. 2016. «Apolipoprotein A-I: the dual face of a protein». *FEBS Letters* 590(23): 4171-79. <http://doi.wiley.com/10.1002/1873-3468.12468> (20 de junio de 2019).
- Azevedo, Estefania P C et al. 2012. «Amyloid fibrils trigger the release of neutrophil extracellular traps (NETs), causing fibril fragmentation by NET-associated elastase». *Journal of Biological Chemistry* 287(44): 37206-18.
- Bakan, A, L M Meireles, y I Bahar. 2011. «ProDy: Protein Dynamics Inferred from Theory and Experiments». *Bioinformatics* 27(11): 1575-77. <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbtr168>.
- Baker, P W et al. 1999. «Ability of Reconstituted High Density Lipoproteins to Inhibit Cytokine-Induced Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells.» *Journal of lipid research* 40(2): 345-53.
- Bashtovyy, Denys, Martin K. Jones, G. M. Anantharamaiah, y Jere P. Segrest. 2011. «Sequence conservation of apolipoprotein A-I affords novel insights into HDL structure-function». *Journal of Lipid Research* 52(3): 435-50.
- Baynes, J W, y M H Dominiczak. 2005. *Bioquímica médica*. Elsevier. <https://books.google.com.ar/books?id=OCWPo8sZok4C>.
- Beerten, Jacinte, Joost Schymkowitz, y Frederic Rousseau. 2012. «Aggregation Prone Regions and Gatekeeping Residues in Protein Sequences.» *Current topics in*

medicinal chemistry 12(22): 2470-78.

- Benson, Merrill D. 2012. «The hereditary amyloidoses». *Amyloid and Related Disorders: Surgical Pathology and Clinical Correlations*: 53-67.
- Benson, Merrill D et al. 2018. «Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee». *Amyloid* 25(4): 215-19. <https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1549825>.
- Benson y col . 2020. «Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee». *Amyloid* 27(4): 217-22. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>.
- de Boer, Onno J et al. 2013. «Neutrophils, Neutrophil Extracellular Traps and Interleukin-17 Associate with the Organisation of Thrombi in Acute Myocardial Infarction.» *Thrombosis and haemostasis* 109(2): 290-97.
- Bradford, M M. 1976. «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.» *Analytical biochemistry* 72: 248-54.
- Brinkmann, Volker et al. 2004. «Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria». *Science*.
- Brock, Jonathan W C et al. 2008. «Increased Methionine Sulfoxide Content of ApoA-I in Type 1 Diabetes.» *Journal of lipid research* 49(4): 847-55.
- Brouillette, C G, G M Anantharamaiah, J a Engler, y D W Borhani. 2001. «Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review.» *Biochimica et biophysica acta* 1531(1-2): 4-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278170>.
- Calabresi, L et al. 1994. «Molecular Characterization of Native and Recombinant Apolipoprotein A-I-Milano Dimer. The Introduction of an Interchain Disulfide Bridge Remarkably Alters the Physicochemical Properties of Apolipoprotein A-I.» *The Journal of biological chemistry* 269(51): 32168-74.
- Calbresi y col . 1997. «Inhibition of VCAM-1 Expression in Endothelial Cells by Reconstituted High Density Lipoproteins.» *Biochemical and biophysical research communications* 238(1): 61-65.
- Camaré, Caroline, Mélanie Pucelle, Anne Nègre-Salvayre, y Robert Salvayre. 2017. «Angiogenesis in the Atherosclerotic Plaque.» *Redox biology* 12: 18-34.
- Canet, Denis et al. 1999. «Mechanistic Studies of the Folding of Human Lysozyme and the Origin of Amyloidogenic Behavior in Its Disease-Related Variants[†]». *Biochemistry* 38(20): 6419-27. <http://dx.doi.org/10.1021/bi983037t>.
- Capra, John A, y Mona Singh. 2007. «Predicting Functionally Important Residues from Sequence Conservation.» *Bioinformatics (Oxford, England)* 23(15): 1875-82.
- Carmeliet, Peter. 2000. «Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis». *Nature Medicine* 6(4): 389-95. <https://doi.org/10.1038/74651>.
- Catapano, Alberico Luigi, Angela Pirillo, Fabrizia Bonacina, y Giuseppe Danilo Norata. 2014. «HDL in innate and adaptive immunity». *Cardiovascular Research* 103(3): 372-83. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu150>.

- Cavigliolo, Giorgio, y Shobini Jayaraman. 2014. «Proteolysis of Apolipoprotein A-I by Secretory Phospholipase A2». *Journal of Biological Chemistry* 289(14): 10011-23. <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.m113.525717>.
- Chan, Gary K L et al. 2015a. «Myeloperoxidase-mediated methionine oxidation promotes an amyloidogenic outcome for apolipoprotein A-I». *Journal of Biological Chemistry* 290(17): 10958-71. <http://www.jbc.org/content/early/2015/03/10/jbc.M114.630442.abstract>.
- Chapman, Matthew R et al. 2002. «Role of Escherichia coli Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation». *Science* 295(5556): 851-55. <https://science.sciencemag.org/content/295/5556/851>.
- Chaudhury, S, S Lyskov, y J J Gray. 2010. «PyRosetta: a script-based interface for implementing molecular modeling algorithms using Rosetta». *Bioinformatics* 26(5): 689-91. <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbtq007>.
- Chen, Xiao-niao et al. 2010. «Simvastatin combined with nifedipine enhances endothelial cell protection by inhibiting ROS generation and activating Akt phosphorylation». *Acta Pharmacologica Sinica* 31(7): 813-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4007722/>.
- Chen, Y H, J T Yang, y H M Martinez. 1972. «Determination of the Secondary Structures of Proteins by Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion.» *Biochemistry* 11(22): 4120-31.
- Chroni, Angeliki et al. 2002. «The Central Helices of ApoA-I Can Promote ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)-mediated Lipid Efflux». *Journal of Biological Chemistry* 278(9): 6719-30. <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.m205232200>.
- Chyra Kufova, Zuzana et al. 2018. «Newly Designed 11-Gene Panel Reveals First Case of Hereditary Amyloidosis Captured by Massive Parallel Sequencing.» *Journal of clinical pathology* 71(8): 687-94.
- Cochran, Blake J, Kwok-Leung Ong, Bikash Manandhar, y Kerry-Anne Rye. 2021. «APOA1: a Protein with Multiple Therapeutic Functions». *Current Atherosclerosis Reports* 23(3): 11. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00906-7>.
- Creighton, T E. 1995. *Protein Structure a Practical Approach*. IRL Press. <https://books.google.at/books?id=hyAEzQEACAAJ>.
- Curtiss, Linda K., David T. Valenta, Neil J. Hime, y Kerry-Anne Anne Rye. 2006. «What Is So Special About Apolipoprotein AI in Reverse Cholesterol Transport?» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26(1): 12-19. <http://atvb.ahajournals.org/content/26/1/12.abstract>.
- Daigneault, Marc et al. 2010. «The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages». *PLOS ONE* 5(1): 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.
- Danese, Silvio, Elisabetta Dejana, y Claudio Fiocchi. 2007. «Immune Regulation by Microvascular Endothelial Cells: Directing Innate and Adaptive Immunity, Coagulation, and Inflammation.» *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178(10): 6017-22.

- Das, Madhurima, Xiaohu Mei, Shobini Jayaraman, David Atkinson, y Olga Gursky. 2014. «Amyloidogenic mutations in human apolipoprotein A-I are not necessarily destabilizing - A common mechanism of apolipoprotein A-I misfolding in familial amyloidosis and atherosclerosis». *FEBS Journal* 281(11): 2525-42.
- Das, Madhurima et al. 2016. «Structural Stability and Local Dynamics in Disease-Causing Mutants of Human Apolipoprotein A-I: What Makes the Protein Amyloidogenic?» *Journal of Molecular Biology* 428(2): 449-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.029>.
- Das, Madhurima, y Olga Gursky. 2015. «Amyloid-Forming Properties of Human Apolipoproteins: Sequence Analyses and Structural Insights». En *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer International Publishing, 175-211. https://doi.org/10.1007%2F978-3-319-17344-3_8.
- Daum, U et al. 1999. «Apolipoprotein A-I (R151C) is Defective in Activation of Lecithin: Cholesterol Acyltransferase but Not in Initial Lipid Binding, Formation of Reconstituted Lipoproteins, or Promotion of Cholesterol Efflux.» *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 77(8): 614-22.
- Davidson, W. Sean, y Thomas B. Thompson. 2007. «The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins.» *The Journal of biological chemistry* 282(31): 22249-53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526499> (19 de junio de 2012).
- Deng, Chengguo et al. 2007. «Angiogenic effect of intercellular adhesion molecule-1». *Journal of Huazhong University of Science and Technology* 27(1): 9-12. <https://doi.org/10.1007/s11596-007-0103-4>.
- Diaz Ludovico, Ivo et al. 2020. «Understanding the role of apolipoprotein A-I in atherosclerosis. Post-translational modifications synergize dysfunction?» *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
- DiDonato, Joseph A. et al. 2013. «The Function and Distribution of Apolipoprotein A1 in the Artery Wall are Markedly Distinct from those in Plasma». *Circulation* 128(15): 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002624. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3882895/>.
- DiDonato, Joseph A et al. 2014. «Site-Specific Nitration of Apolipoprotein A-I at Tyrosine 166 Is Both Abundant within Human Atherosclerotic Plaque and Dysfunctional.» *The Journal of biological chemistry* 289(15): 10276-92.
- Döring, Yvonne, Oliver Soehnlein, y Christian Weber. 2014. «Neutrophils Cast NETs in Atherosclerosis». *Circulation Research* 114(6): 931-34. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.114.303479> (20 de junio de 2019).
- Drew, Brian G et al. 2004. *High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation*.
- Eriksson, Magdalena et al. 2009. «Hereditary apolipoprotein AI-associated amyloidosis in surgical pathology specimens: Identification of three novel mutations in the APOA1 gene». *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 257-62.
- Fernandez-Escamilla, Ana Maria, Frederic Rousseau, Joost Schymkowitz, y Luis Serrano. 2004. «Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the

- aggregation of peptides and proteins». *Nature Biotechnology* 22(10): 1302-6.
- Fiser, A, y A Sali. 2003. «ModLoop: automated modeling of loops in protein structures». *Bioinformatics* 19(18): 2500-2501. <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbtg362>.
- Fisher, Edward A et al. 2012. «High-Density Lipoprotein Function, Dysfunction, and Reverse Cholesterol Transport.» *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(12): 2813-20.
- Fotakis, Panagiotis et al. 2019. «Anti-Inflammatory Effects of HDL (High-Density Lipoprotein) in Macrophages Predominate Over Proinflammatory Effects in Atherosclerotic Plaques». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
- Fowler, Douglas M, Atanas V Koulov, William E Balch, y Jeffery W Kelly. 2007. «Functional amyloid – from bacteria to humans». *Trends in Biochemical Sciences* 32(5): 217-24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003>.
- Freire, E. 1995. «Thermodynamics of Partly Folded Intermediates in Proteins». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 24(1): 141-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.24.060195.001041>.
- Fu, Limin et al. 2012. «CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data». *Bioinformatics* 28(23): 3150-52. <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbts565>.
- Fuchs, Tobias A et al. 2007. «Novel Cell Death Program Leads to Neutrophil Extracellular Traps.» *The Journal of cell biology* 176(2): 231-41.
- Gaddi, Gisela M. et al. 2020a. «Structural analysis of a natural apolipoprotein A-I variant (L60R) associated with amyloidosis». *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Gaddi, Gisela M et al. 2020b. «Structural analysis of a natural apolipoprotein A-I variant (L60R) associated with amyloidosis». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 685: 108347. <https://doi.org/10.1016%2Fj.abb.2020.108347>.
- Gaglione, Rosa et al. 2018. «Cell milieu significantly affects the fate of AApoAI amyloidogenic variants: predestination or serendipity?» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862(3): 377-84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416517303835> (20 de junio de 2019).
- Galley, H F, y N R Webster. 2004. «Physiology of the endothelium». *British Journal of Anaesthesia* 93(1): 105-13. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007091217355976>.
- Georgila, Konstantina, Dimitra Vyrla, y Elias Drakos. 2019. «Apolipoprotein A-I (ApoA-I), Immunity, Inflammation and Cancer». *Cancers* 11(8). <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/8/1097>.
- Giehm, Lise, Nikolai Lorenzen, y Daniel E Otzen. 2011. «Assays for α -Synuclein Aggregation.» *Methods (San Diego, Calif.)* 53(3): 295-305.
- Gillmore, Julian D, y Philip N Hawkins. 2013. «Pathophysiology and treatment of systemic amyloidosis.» *Nature reviews. Nephrology* 9(10): 574-86. <http://www.nature.com/articles/nrneph.2013.171> (28 de enero de 2018).

- Gisonno, Romina A et al. 2020. «Fibrillar conformation of an apolipoprotein A-I variant involved in amyloidosis and atherosclerosis». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1864(4): 129515.
<https://doi.org/10.1016%2Fj.bbagen.2020.129515>.
- Glenner, G G, C W Wong, V Quaranta, y E D Eanes. 1984. «The Amyloid Deposits in Alzheimer's Disease: Their Nature and Pathogenesis.» *Applied pathology* 2(6): 357-69.
- Gogonea, Valentin. 2016a. «Structural insights into high density lipoprotein: Old models and new facts». *Frontiers in Pharmacology* 6(JAN).
- González-Pecchi, Valentina et al. 2015. «Apolipoprotein A-I Enhances Proliferation of Human Endothelial Progenitor Cells and Promotes Angiogenesis through the Cell Surface ATP Synthase.» *Microvascular research* 98: 9-15.
- Gonzalez, Marina C., Juan D. Toledo, M. Alejandra Tricerri, y Horacio A. Garda. 2008a. «The central type Y amphipathic α -helices of apolipoprotein AI are involved in the mobilization of intracellular cholesterol depots». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473(1): 34-41.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986108000921>.
- Gonzalez, Marina C, Juan D Toledo, M Alejandra Tricerri, y Horacio A Garda. 2008b. «The Central Type Y Amphipathic Alpha-Helices of Apolipoprotein AI Are Involved in the Mobilization of Intracellular Cholesterol Depots.» *Archives of biochemistry and biophysics* 473(1): 34-41.
- Gorgojo, Juan et al. 2017a. «Bordetella parapertussis circumvents neutrophil extracellular bactericidal mechanisms». *PLoS ONE* 12(1): 1-25.
- Gorshkova, Irina N. et al. 2006. «Structure and stability of apolipoprotein A-I in solution and in discoidal high-density lipoprotein probed by double charge ablation and deletion mutation». *Biochemistry*.
- Gorshkova, Irina N., Xiaohu Mei, y David Atkinson. 2014. «Binding of human apoA-I[K107del] variant to TG-rich particles: implications for mechanisms underlying hypertriglyceridemia». *Journal of Lipid Research* 55(9): 1876-85.
<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M047241>.
- Groenning, Minna et al. 2007. «Study on the Binding of Thioflavin T to Beta-Sheet-Rich and Non-Beta-Sheet Cavities.» *Journal of structural biology* 158(3): 358-69.
- Guerois, Raphael, Jens Erik Nielsen, y Luis Serrano. 2002. «Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: A study of more than 1000 mutations». *Journal of Molecular Biology* 320(2): 369-87.
- Gupta, Anurag Kumar et al. 2010. «Activated Endothelial Cells Induce Neutrophil Extracellular Traps and Are Susceptible to NETosis-Mediated Cell Death.» *FEBS letters* 584(14): 3193-97.
- Gursky, Olga, y David Atkinson. 1996. «Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(7): 2991-95.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Gustot, Adelin et al. 2013. «Activation of innate immunity by lysozyme fibrils is critically dependent on cross- β sheet structure». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(16): 2999-3012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334185> (11 de noviembre de 2014).
- Hardy, John, y Dennis J Selkoe. 2002. «The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.» *Science (New York, N.Y.)* 297(5580): 353-56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130773>.
- Hawe, Andrea, Marc Sutter, y Wim Jiskoot. 2008. «Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization». *Pharmaceutical Research* 25(7): 1487-99.
- Huang, Wei et al. 2001a. «Recombinant proapoA-I(Lys107del) shows impaired lipid binding associated with reduced binding to plasma high density lipoprotein». *Atherosclerosis*.
- Huang, Ying et al. 2014. «An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma». *Nature Medicine*.
- Iwasaki, Akiko, y Ruslan Medzhitov. 2004. «Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses.» *Nature immunology* 5(10): 987-95.
- Jonas, A et al. 1993. «Structural and Functional Properties of Natural and Chemical Variants of Apolipoprotein A-I.» *Biochimica et biophysica acta* 1166(2-3): 202-10.
- Jorch, Selina K, y Paul Kubes. 2017. «An Emerging Role for Neutrophil Extracellular Traps in Noninfectious Disease.» *Nature medicine* 23(3): 279-87.
- Josefs, Tatjana et al. 2020. «Neutrophil Extracellular Traps Promote Macrophage Inflammation and Impair Atherosclerosis Resolution in Diabetic Mice.» *JCI insight* 5(7).
- Karczewski, Konrad J et al. 2020. «The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans». *Nature* 581(7809): 434-43. <https://doi.org/10.1038%2Fs41586-020-2308-7>.
- Kareinen, Ilona et al. 2018. «Chymase released from hypoxia-activated cardiac mast cells cleaves human apoA-I at Tyr192 and compromises its cardioprotective activity». *Journal of Lipid Research* 59(6): 945-57. <https://doi.org/10.1194%2Fjlr.m077503>.
- Kayikci, Melis et al. 2018. «Visualization and analysis of non-covalent contacts using the Protein Contacts Atlas». *Nature Structural & Molecular Biology* 25(2): 185-94. <https://doi.org/10.1038%2Fs41594-017-0019-z>.
- Kelényi, G. 1967. «On the Histochemistry of Azo Group-Free Thiazole Dyes.» *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 15(3): 172-80.
- Khurana, Ritu et al. 2005. «Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils». 151: 229-38.
- Kitao, Akio, y Nobuhiro Go. 1999. «Investigating protein dynamics in collective coordinate space». *Current Opinion in Structural Biology* 9(2): 164-69. <https://doi.org/10.1016%2Fs0959-440x%2899%2980023-2>.
- Von Köckritz-Blickwede, Maren, Ohn A. Chow, y Victor Nizet. 2009. «Fetal calf serum

- contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps». *Blood*.
- Kontush, A.; Chapman, M.J. 2011. «High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function, and Therapeutics». En *High-Density Lipoproteins*, Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118158678.ch3>.
- Koonin, Eugene V. 2005. «Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics.» *Annual review of genetics* 39: 309-38.
- Koster, J, y S Rahmann. 2012. «Snakemake--a scalable bioinformatics workflow engine». *Bioinformatics* 28(19): 2520-22. <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbts480>.
- Krebs, M R H, E H C Bromley, y A M Donald. 2005. «The Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils: Localisation and Implications.» *Journal of structural biology* 149(1): 30-37.
- Krishnamoorthy, Aparna et al. 2018. «Effect of curcumin on amyloid-like aggregates generated from methionine-oxidized apolipoprotein A-I». *FEBS Open Bio* 8(2): 302-10. <http://doi.wiley.com/10.1002/2211-5463.12372> (20 de junio de 2019).
- Kunnen, Sandra, y Miranda Van Eck. 2012. «Lecithin:Cholesterol Acyltransferase: Old Friend or Foe in Atherosclerosis?» *Journal of lipid research* 53(9): 1783-99.
- Laemmli, U K. 1970. «Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.» *Nature* 227(5259): 680-85.
- Lakowicz, Joseph R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy *Principles of fluorescence spectroscopy*.
- Langenberg, Tobias et al. 2020. «Thermodynamic and Evolutionary Coupling between the Native and Amyloid State of Globular Proteins». *Cell Reports* 31(2): 107512. <https://doi.org/10.1016%2Fj.celrep.2020.03.076>.
- Lawson, Charlotte, y Sabine Wolf. 2009. «ICAM-1 signaling in endothelial cells». *Pharmacological Reports* 61(1): 22-32. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1734114009700040>.
- Lee, Esther Y. et al. 2013. «HDL deficiency due to a new insertion mutation (ApoA-*INashua*) and review of the literature». *Journal of Clinical Lipidology*.
- Lee, Saet-byul et al. 2009. «Identification of the amino acid sequence motif of alpha-synuclein responsible for macrophage activation.» *Biochemical and biophysical research communications* 381(1): 39-43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351591> (26 de junio de 2012).
- Leman, Luke J, Bruce E Maryanoff, y M Reza Ghadiri. 2013. «Molecules That Mimic Apolipoprotein A-I: Potential Agents for Treating Atherosclerosis». *Journal of Medicinal Chemistry* 57(6): 2169-96. <https://doi.org/10.1021%2Fjm4005847>.
- LeVine, H 3rd. 1999. «Quantification of Beta-Sheet Amyloid Fibril Structures with Thioflavin T.» *Methods in enzymology* 309: 274-84.
- Levine III, Harry. 1993. «Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution». *Protein Science*

- 2(3): 404-10. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.5560020312>.
- Libby, Peter et al. 2019. «Atherosclerosis». *Nature Reviews Disease Primers* 5(1): 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>.
- Linding, Rune et al. 2004. «A Comparative Study of the Relationship Between Protein Structure and β -Aggregation in Globular and Intrinsically Disordered Proteins». *Journal of Molecular Biology* 342(1): 345-53. <https://doi.org/10.1016%2Fj.jmb.2004.06.088>.
- Liu, Ying, y Ivet Bahar. 2012. «Sequence Evolution Correlates with Structural Dynamics». *Molecular Biology and Evolution* 29(9): 2253-63. <https://doi.org/10.1093%2Fmolbev%2Fmss097>.
- Ljunggren, Stefan et al. 2014. «ApoA-I Mutations, L202P and K131del, in HDL from Heterozygotes with Low HDL-C.» *Proteomics. Clinical applications* 8(3-4): 241-50.
- López, Enrique A., y Santiago D. Solares. 2014. «El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones». *Revista de la Universidad del Valle Guatemala* (September): 14-28.
- Louros, Nikolaos N et al. 2015. «Chameleon “aggregation-prone” segments of apoA-I: A model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis.» *International journal of biological macromolecules* 79: 711-18. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813015003736>.
- Lund-Katz, Sissel, y Michael C Phillips. 2010. «High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport». En *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins.*; Springer Netherlands, 183-227. https://doi.org/10.1007%2F978-90-481-8622-8_7.
- Lyu, Junfang, Eun Ju Yang, y Joong Sup Shim. 2019. «Cholesterol Trafficking: An Emerging Therapeutic Target for Angiogenesis and Cancer.» *Cells* 8(5).
- Machado, Matías R et al. 2019. «The SIRAH 2.0 Force Field: Altius, Fortius, Citius». *Journal of Chemical Theory and Computation* 15(4): 2719-33. <https://doi.org/10.1021%2Facs.jctc.9b00006>.
- Machado, Matías R, y Sergio Pantano. 2016. «SIRAH tools: mapping, backmapping and visualization of coarse-grained models». *Bioinformatics* 32(10): 1568-70. <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbtw020>.
- Machado et al . 2020. «Split the Charge Difference in Two! A Rule of Thumb for Adding Proper Amounts of Ions in MD Simulations». *Journal of Chemical Theory and Computation* 16(3): 1367-72. <https://doi.org/10.1021%2Facs.jctc.9b00953>.
- Manthei, Kelly A et al. 2020. «Structural analysis of lecithin:cholesterol acyltransferase bound to high density lipoprotein particles». *Communications Biology* 3(1). <https://doi.org/10.1038%2F42003-019-0749-z>.
- Martins, Samantha M, Alex Chapeaurouge, y Sérgio T Ferreira. 2003. «Folding Intermediates of the Prion Protein Stabilized by Hydrostatic Pressure and Low Temperature». *Journal of Biological Chemistry* 278(50): 50449-55. <http://www.jbc.org/content/278/50/50449.abstract>.
- Matsunaga, Akira, Yoshinari Uehara, Bo Zhang, y Keijiro Saku. 2010a. «Apolipoprotein

- A-I mutations». En *The HDL Handbook*, Elsevier Inc., 133-51.
- Mcguire, Kirsten Arnvig, y William Sean Davidson. 1996. «High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I». 37.
- Megens, Remco T A et al. 2012. «Presence of Luminal Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis.» *Thrombosis and haemostasis* 107(3): 597-98.
- Mei, X., y D. Atkinson. 2011. «Crystal Structure of C-terminal Truncated Apolipoprotein A-I Reveals the Assembly of High Density Lipoprotein (HDL) by Dimerization.» *J.Biol.Chem.* 286: 38570-82. <http://www.rcsb.org/structure/3R2P> (1 de noviembre de 2018).
- Melchior, John T et al. 2017. «A consensus model of human apolipoprotein A-I in its monomeric and lipid-free state». *Nature Structural & Molecular Biology* 24(12): 1093-99. <https://doi.org/10.1038%2Fnsmb.3501>.
- Merlini, Giampaolo, y Vittorio Bellotti. 2003a. «Molecular mechanisms of amyloidosis.» *Amyloid International Journal Of Experimental And Clinical Investigation* 349(19): 583-96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904524>.
- Mizuguchi, Chiharu et al. 2019. «Mechanisms of aggregation and fibril formation of the amyloidogenic N-terminal fragment of apolipoprotein A-I». *Journal of Biological Chemistry* 294(36): 13515-24. <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.ra119.008000>.
- Monsellier, Elodie, Matteo Ramazzotti, Niccolò Taddei, y Fabrizio Chiti. 2008. «Aggregation Propensity of the Human Proteome» ed. Ruth Nussinov. *PLoS Computational Biology* 4(10): e1000199. <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pcbi.1000199>.
- Moschonas, Iraklis C, y Alexandros D Tselepis. 2019. «The Pathway of Neutrophil Extracellular Traps towards Atherosclerosis and Thrombosis.» *Atherosclerosis* 288: 9-16.
- Mosmann, Tim. 1983. «Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays». 65: 55-63.
- MU, Wei E I et al. 2015. «Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in the aortic tissues of atherosclerotic patients and the associated clinical implications». *Experimental and Therapeutic Medicine* 10(2): 423-28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509110/>.
- Mucchiano, G I, B Häggqvist, K Sletten, y P Westermark. 2001. «Apolipoprotein A-I-derived amyloid in atherosclerotic plaques of the human aorta.» *The Journal of pathology* 193(2000): 270-75.
- Mucchiano, Gerd I., Bo Häggqvist, Knut Sletten, y Per Westermark. 2001. «Apolipoprotein A-I-derived amyloid in atherosclerotic plaques of the human aorta». *Journal of Pathology*.
- Mucchiano, Gerd I, Lena Jonasson, Eibert Einarsson, y Per Westermark. 2001. «Apolipoprotein A-I-Derived Amyloid in Atherosclerosis». : 298-303.
- Munishkina, Larissa A, y Anthony L Fink. 2007. «Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768(8): 1862-85.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273607000806>.

- Muñoz-Vega, Mónica et al. 2018. «Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality». *Lipids in Health and Disease* 17(1): 44. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0695-7>.
- Nahuel A. Ramella, Isabel Andújar, José L. Ríos, Silvana A. Rosú, M. Alejandra, y Guillermo R. Schinella Tricerri. 2018. «" Human apolipoprotein A-I Gly26Arg stimulation of inflammatory responses via NF-κB activation : Potential roles in amyloidosis ?» *Pathophys* 81.
- Netea, Mihai G et al. 2017. «A guiding map for inflammation». *Nature Immunology* 18(8): 826-31. <https://doi.org/10.1038/ni.3790>.
- Nissen, Steven E et al. 2003. «Effect of Recombinant ApoA-I Milano on Coronary Atherosclerosis in Patients with Acute Coronary Syndromes: A Randomized Controlled Trial.» *JAMA* 290(17): 2292-2300.
- Nofer, J R et al. 1995. «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.» *Human genetics* 96(2): 177-82.
- O'Brien, Richard J, y Philip C Wong. 2011. «Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease.» *Annual review of neuroscience* 34: 185-204. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3174086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (26 de octubre de 2012).
- O'Connell, B J, y J Jr Genest. 2001. «High-Density Lipoproteins and Endothelial Function.» *Circulation* 104(16): 1978-83.
- O'Leary, Nuala A et al. 2015. «Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation». *Nucleic Acids Research* 44(D1): D733--D745. <https://doi.org/10.1093/nar/nfv1189>.
- Obici, Laura et al. 2006. «Structure , function and amyloidogenic propensity of apolipoprotein A-I». 13(December): 191-205.
- Oda, Michael N. 2017. «Lipid-free apoA-I structure - Origins of model diversity». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862(2): 221-33.
- Onuchic, J N, Z Luthey-Schulten, y P G Wolynes. 1997. «Theory of protein folding: the energy landscape perspective.» *Annual review of physical chemistry* 48(1): 545-600. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348663>.
- Ouimet, Mireille, Tessa J Barrett, y Edward A Fisher. 2019. «HDL and Reverse Cholesterol Transport.» *Circulation research* 124(10): 1505-18.
- Panzenböck, U et al. 2000. «Oxidation of Methionine Residues to Methionine Sulfoxides Does Not Decrease Potential Antiatherogenic Properties of Apolipoprotein A-I.» *The Journal of biological chemistry* 275(26): 19536-44.
- Petrlova, Jitka et al. 2012. «The fibrillogenic L178H variant of apolipoprotein A-I forms helical fibrils». *The Journal of Lipid Research* 53(3): 390-98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22184756> (26 de junio de 2012).

- Pettersen, Eric F et al. 2004. «UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis». *Journal of Computational Chemistry* 25(13): 1605-12. <https://doi.org/10.1002%2Fjcc.20084>.
- Picken, M M. 2020. «The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review». *Acta Haematologica* 143(4): 322-34. <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000506696>.
- Piovesan, Damiano, Giovanni Minervini, y Silvio~C. E Tosatto. 2016. «The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks». *Nucleic Acids Research* 44(W1): W367--W374. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkw315>.
- Pober, Jordan S, y William C Sessa. 2007. «Evolving functions of endothelial cells in inflammation.» *Nature reviews. Immunology* 7(10): 803-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893694> (2 de noviembre de 2012).
- Ponsin, G, A M Jr Gotto, G Utermann, y H J Pownall. 1985. «Abnormal Interaction of the Human Apolipoprotein A-I Variant [Lys107----O] with High Density Lipoproteins.» *Biochemical and biophysical research communications* 133(3): 856-62.
- Ponzoni, Luca, Daniel A Peñaherrera, Zoltán N Oltvai, y Ivet Bahar. 2020. «Rhapsody: predicting the pathogenicity of human missense variants» ed. Yann Ponty. *Bioinformatics* 36(10): 3084-92. <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbtaa127>.
- Poston, Robin N. 2019. «Atherosclerosis: Integration of Its Pathogenesis as a Self-Perpetuating Propagating Inflammation: A Review.» *Cardiovascular endocrinology & metabolism* 8(2): 51-61.
- Pourmousa, Mohsen et al. 2018. «Tertiary structure of apolipoprotein A-I in nascent high-density lipoproteins». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(20): 5163-68. <https://www.pnas.org/content/115/20/5163>.
- Prieto, E.D. Eduardo Daniel E.D. Eduardo Daniel et al. 2012. «Characterization of a human apolipoprotein A-I construct expressed in a bacterial system». *Protein Journal* 31(8): 681-88.
- Purdie, Neil. 1996. «Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules Edited by Gerald D. Fasman (Brandeis University). Plenum Press: New York. 1996. x + 738 pp. \$125.00. ISBN 0-306-45142-5.» *Journal of the American Chemical Society* 118(50): 12871. <https://doi.org/10.1021/ja965689f>.
- Qi, Haozhe, Shuofei Yang, y Lan Zhang. 2017. «Neutrophil Extracellular Traps and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis and Thrombosis.» *Frontiers in immunology* 8: 928.
- Quintas, Alexandre et al. 2001. «Tetramer Dissociation and Monomer Partial Unfolding Precedes Protofibril Formation in Amyloidogenic Transthyretin Variants». *Journal of Biological Chemistry* 276(29): 27207-13.
- Rader, Daniel J, y Alan R Tall. 2012. «The Not-so-Simple HDL Story: Is It Time to Revise the HDL Cholesterol Hypothesis?» *Nature medicine* 18(9): 1344-46.
- Raimondi, Sara et al. 2011. «Effects of the known pathogenic mutations on the aggregation pathway of the amyloidogenic peptide of apolipoprotein A-I». *Journal*

of Molecular Biology 407(3): 465-76.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.044>.

Rajabi, Mehdi, y Shaker A Mousa. 2017. «The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment». *Biomedicines* 5(2). <https://www.mdpi.com/2227-9059/5/2/34>.

Rall, S C et al. 1984. «Abnormal lecithin:cholesterol acyltransferase activation by a human apolipoprotein A-I variant in which a single lysine residue is deleted.» *Journal of Biological Chemistry* 259(16): 10063-70.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818909282>.

Ramella, N.A. et al. 2011. «Human apolipoprotein A-I-derived amyloid: Its association with atherosclerosis». *PLoS ONE* 6(7): e22532.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3139661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2 de noviembre de 2012).

Ramella, N.A. Nahuel A. N.A. et al. 2012. «Human Apolipoprotein A-I Natural Variants: Molecular Mechanisms Underlying Amyloidogenic Propensity». *PLoS ONE* 7(8): e43755.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3429494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (17 de noviembre de 2014).

Ramella, Nahuel A. et al. 2011. «Human apolipoprotein A-I-derived amyloid: Its association with atherosclerosis». *PLoS ONE* 6(7).

Ramella et al. 2012. «Human Apolipoprotein A-I Natural Variants: Molecular Mechanisms Underlying Amyloidogenic Propensity» ed. Vladimir N. Uversky. *PLoS ONE* 7(8): e43755. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043755> (28 de enero de 2018).

Ramella, Nahuel a et al. 2012. «Human apolipoprotein A-I natural variants: molecular mechanisms underlying amyloidogenic propensity.» *PloS one* 7(8): e43755.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3429494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (17 de noviembre de 2014).

Reed-Geaghan, Erin G, Julie C Savage, Amy G Hise, y Gary E Landreth. 2009. «CD14 and Toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation». *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(38): 11982-92.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2778845/>.

Rosenson, Robert S. et al. 2016. «Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease». *Nature Reviews Cardiology*.

Rosú, Silvana A., Omar J. Rimoldi, Eduardo D. Prieto, Lucrecia M. Curto, et al. 2015. «Amyloidogenic propensity of a natural variant of human apolipoprotein A-I: Stability and interaction with ligands». *PLoS ONE* 10(5): 1-17.

Rosú, Silvana A. S.A. Silvana A. S.A. et al. 2015. «Amyloidogenic propensity of a natural variant of human apolipoprotein A-I: Stability and interaction with ligands». *PLoS ONE* 10(5): 1-17.

Rosú, Silvana A, Omar J Rimoldi, Eduardo D Prieto, y Lucrecia M Curto. 2015. «Amyloidogenic Propensity of a Natural Variant of Human Apolipoprotein A-I: Stability and Interaction with Ligands». : 1-17.

- Roychaudhuri, Robin, Mingfeng Yang, Minako M Hoshi, y David B Teplow. 2009. «Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease.» *The Journal of biological chemistry* 284(8): 4749-53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845536> (26 de octubre de 2012).
- Ryan, Robert O, Trudy M Forte, y Michael N Oda. 2003. «Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I.» *Protein expression and purification* 27(1): 98-103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509990>.
- Safi, Wael, J Nicholas Maiorano, y W Sean Davidson. 2001. «A proteolytic method for distinguishing between lipid-free and lipid-bound apolipoprotein A-I.» *Journal of Lipid Research* 42(5): 864-72. <http://www.jlr.org/content/42/5/864.abstract>.
- Šali, Andrej, y Tom L Blundell. 1993. «Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints.» *Journal of Molecular Biology* 234(3): 779-815. <https://doi.org/10.1006%2Fjmbi.1993.1626>.
- Schaefer, Ernst J, Pimjai Anthanont, y Bela F Asztalos. 2014. «High-Density Lipoprotein Metabolism, Composition, Function, and Deficiency.» *Current opinion in lipidology* 25(3): 194-99.
- Schmid, Franz Xaver. 1989. «Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes.» En *Protein structure. A practical approach.*,
- Schmidt, Carla, y Carol V Robinson. 2014. «A comparative cross-linking strategy to probe conformational changes in protein complexes.» *Nature protocols* 9(9): 2224-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144272>.
- Schwertani, Adel, Hong Y Choi, y Jacques Genest. 2018. «HDLs and the pathogenesis of atherosclerosis.» *Current Opinion in Cardiology* 33(3). https://journals.lww.com/co-cardiology/Fulltext/2018/05000/HDLs_and_the_pathogenesis_of_atherosclerosis.9.aspx.
- Segrest, J P et al. 1992. «The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function.» *Journal of Lipid Research* 33(2): 141-66. <http://www.jlr.org/content/33/2/141.abstract>.
- Segrest et al. 1999. «A Detailed Molecular Belt Model for Apolipoprotein A-I in Discoidal High Density Lipoprotein.» *The Journal of biological chemistry* 274(45): 31755-58.
- Shao, Baohai et al. 2005. «Acrolein Impairs ATP Binding Cassette Transporter A1-dependent Cholesterol Export from Cells through Site-specific Modification of Apolipoprotein A-I*.» *Journal of Biological Chemistry* 280(43): 36386-96. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820594441>.
- Shi, Chao, y Eric G Pamer. 2011. «Monocyte recruitment during infection and inflammation.» *Nature reviews. Immunology* 11(11): 762-74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984070> (2 de noviembre de 2012).
- Sievers, Fabian et al. 2011. «Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.» *Molecular Systems Biology* 7(1): 539. <https://doi.org/10.1038%2Fmsb.2011.75>.
- Sinz, Andrea. 2006. «Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry to Map Three-

- Dimensional Protein Structures and Protein-Protein Interactions.» *Mass spectrometry reviews* 25(4): 663-82.
- Sipe, Jean D. et al. 2014. «Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis». *Amyloid* 21(4): 221-24.
- Sipe, Jean D et al. 2010. «Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis». *Amyloid* 17(3-4): 101-4. <https://doi.org/10.3109/13506129.2010.526812>.
- Sipe et al. 2016. «Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines». *Amyloid* 23(4): 209-13. <https://doi.org/10.1080%2F13506129.2016.1257986>.
- Sorci-Thomas, Mary G, y Michael J Thomas. 2002. «The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration.» *Trends in cardiovascular medicine* 12(3): 121-28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007737>.
- Sørensen, Ole E, y Niels Borregaard. 2016. «Neutrophil Extracellular Traps - the Dark Side of Neutrophils.» *The Journal of clinical investigation* 126(5): 1612-20.
- Stone, P J et al. 1993. «Neutrophil Proteases Associated with Amyloid Fibrils.» *Biochemical and biophysical research communications* 197(1): 130-36.
- Swerlick, Robert A., y Thomas J. Lawley. 1993. «Role of microvascular endothelial cells in inflammation». *Journal of Investigative Dermatology* 100(1): S111-15. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.1993.33>.
- Sydykova, Dariya K, Benjamin R Jack, Stephanie J Spielman, y Claus O Wilke. 2018. «Measuring evolutionary rates of proteins in a structural context». *F1000Research* 6: 1845. <https://doi.org/10.12688%2Ff1000research.12874.2>.
- Tartaglia, Gian Gaetano, y Michele Vendruscolo. 2010. «Proteome-Level Interplay between Folding and Aggregation Propensities of Proteins». *Journal of Molecular Biology* 402(5): 919-28. <https://doi.org/10.1016%2Fj.jmb.2010.08.013>.
- Tedesco, Serena et al. 2018. «Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization?» *Frontiers in Pharmacology* 9: 71. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00071>.
- Tiberti, Matteo et al. 2019. «MutateX: an automated pipeline for in-silico saturation mutagenesis of protein structures and structural ensembles». <https://doi.org/10.1101%2F824938>.
- Tilly-Kiesi, M. et al. 1995. «ApoA-I(Helsinki) (Lys107→O) associated with reduced HDL cholesterol and LpA-I:A-II deficiency». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
- Tilly-Kiesi, M et al. 1997. 17 Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *Subjects with ApoA-I(Lys107→O) exhibit enhanced fractional catabolic rate of ApoA-I in Lp(AI) and ApoA-II in Lp(AI with AII)*.
- Tilly-Kiesi, Marju et al. 1997. «Subjects with ApoA-I(Lys107→O) exhibit enhanced fractional catabolic rate of ApoA-I in Lp(AI) and ApoA-II in Lp(AI with AII)».

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.

- Ungvari, Zoltan et al. 2018. «Endothelial Dysfunction and Angiogenesis Impairment in the Ageing Vasculature.» *Nature reviews. Cardiology* 15(9): 555-65.
- Virtanen, Pauli et al. 2020. «SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python». *Nature Methods* 17(3): 261-72. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>.
- Walsh, Dominic M, y Dennis J Selkoe. 2007. «A Beta Oligomers - a Decade of Discovery.» *Journal of neurochemistry* 101(5): 1172-84.
- Waskom, Michael, y the seaborn development team. 2020. «mwaskom/seaborn». <https://doi.org/10.5281/zenodo.592845>.
- Westermarck, P P et al. 1995. «Apolipoprotein A1-derived amyloid in human aortic atherosclerotic plaques.» *Am J Pathol* 147(5): 1186-92. <http://pubget.com/paper/7485381>.
- Witkowski, Andrzej et al. 2018. «Methionine oxidized apolipoprotein A-I at the crossroads of HDL biogenesis and amyloid formation». *The FASEB Journal* 32(6): 3149-65. <https://doi.org/10.1096%2Ffj.201701127r>.
- Wong, Y. Q., K. J. Binger, G. J. Howlett, y M. D. W. Griffin. 2010. «Methionine oxidation induces amyloid fibril formation by full-length apolipoprotein A-I». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(5): 1977-82.
- Wong, Yuan Qi, Katrina J Binger, Geoffrey J Howlett, y Michael D W Griffin. 2010. «Methionine oxidation induces amyloid fibril formation by full-length apolipoprotein A-I.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(5): 1977-82. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2836622&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> (2 de marzo de 2012).
- Wong et al. 2012. «Identification of an amyloid fibril forming peptide comprising residues 46-59 of apolipoprotein A-I.» *FEBS letters* 586(13): 1754-58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609356> (2 de noviembre de 2012).
- Wright, Helen L, Robert J Moots, Roger C Bucknall, y Steven W Edwards. 2010. «Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases.» *Rheumatology (Oxford, England)* 49(9): 1618-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338884> (16 de marzo de 2012).
- Xu, Y et al. 1994. «Characterization of Expression and Modulation of Cell Adhesion Molecules on an Immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Line (HMEC-1).» *The Journal of investigative dermatology* 102(6): 833-37.
- Yates, Andrew D et al. 2019. «Ensembl 2020». *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkz966>.
- Yousaf, Aisha, Muhammad Sohail Raza, y Amir Ali Abbasi. 2015. «The Evolution of Bony Vertebrate Enhancers at Odds with Their Coding Sequence Landscape». *Genome Biology and Evolution* 7(8): 2333-43. <https://doi.org/10.1093%2Fgbe%2Fevv146>.