

Abreviaturas:

aa: aminoácido.

ANS: ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico.

Apo AI: apolipoproteína AI.

ASD-LPS: LPS derivatizado con reactivo fotoactivable 2-(p-azidosalicilamido)-1,3'-ditiopropionato.

BPI: bactericidal/permeability increasing protein.

C-terminal (Ct): extremo carboxilo-terminal.

CMC: concentración micelar crítica.

CNBr: bromuro de cianógeno.

Col: colesterol.

DMPC: dimiristoil-fosfatidilcolina.

DOC: deoxicolato de sodio.

DOPC: dioleoil-fosfatidilcolina.

DPPC: dipalmitoil-fosfatidilcolina.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

FITC-LPS: Lipopolisacárido derivatizado con isotiocianato de fluoresceína.

FRET: transferencia de energía por resonancia.

GndHCl: cloruro de guanidinio.

GP: polarización generalizada.

GUV: vesículas unilamelares gigantes.

HDL: lipoproteínas de alta densidad (High density lipoprotein).

KDO: ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico.

LBP: proteína de unión al lipopolisacárido (Lipopolysaccharide Binding Protein).

LPS: lipopolisacárido.

LUV: vesículas unilamelares grandes.

MC-540: merocianina 540

MLV: vesículas multilamelares.

N-terminal (Nt): extremo amino-terminal.

NBD-PE: N-(7 nitro 2,1,3 benzoxadiazol-4 il fosfatidiletanolamina).

NBS: N-bromosuccinimida.

PAGGE: electroforesis en gradiente en gel de poliacrilamida.

PC: fosfatidilcolina.

PL: fosfolípido.

PS: fosfatidilserina.

rHDL: HDL reconstituidas.

R-LPS: LPS rugoso (mutante).

Rh-PE: Rodamina-fosfatidiletanolamina.

S-LPS: LPS liso o completo (*wild-type*).

SASD: Sulfosuccinimidyl 2-(p-azidosalicylamido)-1,3'-ditiopropionato.

SDS: dodecil-sulfato de sodio.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio.

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α .

Trp: triptofano.

Tt: temperatura de transición.

TX-100: Tritón x-100.

UV: ultravioleta.

VME: vesículas de membrana externa.

Indice:

	Pág.
Capítulo I: Introducción general.	1
I.1- LPS: composición química y estructura.	1
I.2- LPS y sepsis: aspectos moleculares.	5
I.3-Rol de la LBP en la activación-neutralización de la respuesta al LPS.	8
I.4- Rol de las lipoproteínas en la neutralización del LPS y en la modulación de la respuesta de fase aguda en la sepsis.	11
I.5- HDL y sepsis.	13
I.6- Rol de los lípidos en la neutralización del LPS.	17
I.7- Rol de la apolipoproteína AI (apo AI) en la neutralización.	19
I.8- Estrategias para neutralizar LPS.	21
I.8.1-Polimixina B y derivados.	21
I.8.2- BPI (Bactericidal/Permeability Increasing Protein) / BNEP.	23
I.8.3- Componente P Amieloide Sérico (SAP).	23
I.8.4-NK-2.	24
I.8.5- Lactoferrina.	24
I.8.6- Péptidos miméticos de apoA-I.	25
I.9- Perspectivas.	26
I.10.- Objetivos.	26
I.11- Bibliografía.	28
Capítulo II: Materiales y métodos generales.	43
II.1-Lipopolisacáridos.	43
II.2- Purificación de apo-AI.	43

III.3- Cuantificación de proteínas: Método de Lowry.	44
II.4- Electroforesis.	44
II.4.1- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	45
II.4.2- Electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente en condiciones nativas (PAGGE).	46
II.4.3- Electroforesis en sistemas de geles Tris-Tricina.	46
II.5- Tinción de proteínas.	47
II.6- <i>Western Blot</i> .	47
II.7- Preparación de sistemas modelo de membranas (liposomas).	48
II.8- Métodos de Fluorescencia.	49
II.8.1- Fundamentos general.	49
II.8.1.1- Corrimiento de Stokes.	51
II.8.1.2- <i>Quenching</i> de fluorescencia.	51
II.8.1.3- Transferencia de energía.	52
II.8.1.4- <i>Scattering</i> .	53
II.8.2 Fluorescencia en proteínas.	53
II.9- Bibliografía.	55
Capítulo III: Efecto del LPS sobre la funcionalidad de apo AI.	56
III.1- Introducción.	56
III.2-Materiales y Métodos.	59
III.2.1- Materiales.	59
III.2.2- Solubilización de liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC) por acción de la apo AI.	59
III.2.3- Solubilización de liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC) por acción del LPS.	59

III.2.4- Medida de espectros de emisión de los Trp 60 de la apo A1.	
III.2.5- Espectros de absorción de Merocianina 540 (MC 540).	60
III.3- Resultados y Discusión.	62
III.3.1- Solubilización de liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC): Ensayo de micelización.	62
III.3.2- Caracterización de los productos de micelización.	65
III.3.3 Efecto del LPS en la fluorescencia intrínseca de la apo A1.	67
III.3.4- Determinación de la temperatura de transición de fase de DMPC. Efecto del LPS.	69
III.4- Bibliografía.	72
Capítulo IV: Interacción del LPS con membranas.	76
IV.1- Introducción.	76
IV.2-Materiales y métodos.	79
<u>Parte A</u> : Estudios de la interacción de LPS en solución con sistemas modelo de membrana.	79
IV.2A.1- Materiales.	79
IV.2A.2- Medidas de Potencial Zeta (ζ) en liposomas.	79
IV.2A.3- Ensayos de transferencia de energía por resonancia (FRET).	80
IV.2A.4- Ensayos de fluorescencia de FITC.	81
IV.2A.5- Medidas de polarización generalizada (GP) del Laurdan.	81
<u>Parte B</u> : Visualización y análisis de la distribución de LPS	84

en bicapas de fosfolípidos.	
IV.2B.1- Materiales.	84
IV.2B.2- Preparación de vesículas unilamelares gigantes (GUVs).	85
IV.2B.3- Microscopía de dos-fotones de los GUVs.	86
IV.2B.4- Fluorescencia del FITC-LPS.	88
IV.2B.5- Polarización generalizada del Laurdan e imágenes de GP.	89
<u>Parte C</u> : Comparación del efecto de la incorporación del LPS y colesterol en membranas.	92
IV.2B.6- Preparación de liposomas multilamelares conteniendo LPS.	92
IV.2B.7- Ensayo de solubilización de liposomas.	93
IV.3- Resultados y Discusión.	94
<u>Parte A</u> : Estudios de la interacción de LPS en solución con sistemas modelo de membranas.	94
IV.3A.1- Medidas de Potencial Zeta.	94
IV.3A.2- Experimentos de FRET.	95
IV.3A.3- Ensayos de <i>dequenching</i> del LPS-FITC.	99
IV.3A.4- Polarización generalizada del Laurdan (GP).	101
<u>Parte B</u> : Visualización y análisis de la distribución de LPS en bicapas de fosfolípidos.	104
IV.3B.1- Observación de la incorporación del LPS en bicapas fosfolipídicas, por microscopía de fluorescencia de dos-fotones y fluorescencia del FITC.	104
IV.3B.2- Efecto del LPS en la dependencia de la función GP con la temperatura, observado	109

por microscopía de fluorescencia de dos-fotones.	
<u>Parte C</u> : Comparación de las propiedades de membranas conteniendo LPS o colesterol.	110
IV.3C.1- Ensayos de solubilización de liposomas por acción de detergentes.	111
IV.3C.2- Empaquetamiento de los lípidos en membranas que contienen LPS o colesterol.	114
IV.4- Bibliografía.	118
Capítulo V: Interacción del LPS con apo AI.	124
V.1- Introducción.	124
V.2- Materiales y métodos.	128
V.2.1- Materiales.	128
V.2.2- Modificación química de los residuos Triptofano de la apo AI con N-bromosuccinimida (NBS).	128
V.2.3- Fluorescencia del 8-anilino-1-naftalensulfonato (ANS). Espectros de emisión y ensayos de FRET.	129
V.2.4- Desnaturalización de la apo AI y apo AI-LPS con Cloruro de Guanidinio (GndHCl).	130
V.2.5- Proteólisis limitada.	131
V.2.6- Dicroísmo Circular.	131
V.2.7- Síntesis de ASD-LPS.	132
V.2.8- Marcado del ASD-LPS con ¹²⁵ I.	133
V.2.9- Ensayos de <i>cross-linking</i> con ¹²⁵ I-ASD-LPS.	134
V.2.10- Proteólisis de apo AI con CNBr.	135
V.2.11- Secuenciamiento de los fragmentos de apo AI que unen LPS.	136

V.3- Resultados y Discusión.	137
V.3.1- Modificación química de los residuos Trp de apo AI con N-bromosuccinimida (NBS).	137
V.3.2- Experimentos de unión de ANS.	138
V.3.3- Ensayos de desnaturalización de apo AI y apo AI-LPS con GndHCl.	140
V.3.4- Proteólisis Limitada.	144
V.3.5- Espectros de dicroísmo circular.	146
V.3.6- Ensayos de cross-linking entre apo AI y ¹²⁵ I-ASD-LPS.	148
V.3.7- Clivaje de apo AI y apo AI-LPS con CNBr.	149
V.4- Bibliografía.	152
 Capítulo VI: Neutralización de la actividad endotóxica del LPS.	 156
VI.1- Introducción.	156
VI.2- Materiales y métodos.	160
VI.2.1- Materiales.	160
VI.2.2- Ensayos de actividad antimicrobiana de apo AI.	160
VI.2.3- Purificación por electroelución de uno de los fragmentos de apo AI obtenido por proteólisis con CNBr.	160
VI.2.4- Ensayos de neutralización de la toxicidad del LPS. Determinaciones de liberación de TNF- α por ELISA.	161
VI.3- Resultados y discusión.	163
VI.3.1- Ensayos de actividad antimicrobiana de apo AI.	163
VI.3.2- Neutralización de la endotoxicidad del	165

LPS por apo A1 y por el fragmento proteolítico denominado banda F.	
VI.3.3- Neutralización de la endotoxicidad del LPS por liposomas neutros, en solución.	166
VI.4- Bibliografía.	169
Capitulo VII: Discusión General y Conclusiones.	176
VII.1- Bibliografía.	187

Capítulo I: Introducción General

Capítulo I: Introducción General.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) o endotoxina, es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Pertenece al grupo de estimuladores más potentes del sistema inmune y juega un rol importante en la patogénesis y manifestación de las infecciones por bacterias Gram-negativas, en general, y del shock séptico, en particular (Bone, 1991).

I.1- LPS: composición química y estructura.

El LPS representa entre un 10-15% del total de las moléculas presentes en la membrana externa y ocupa estimativamente un 75% de la superficie de la bacteria. Se trata de una molécula anfifílica con una composición que presenta variaciones intra e inter especie.

Las moléculas de lipopolisacárido están compuestas por el lípido A que representa la parte hidrofóbica de la molécula y a través del cuál se inserta en la membrana externa de la bacteria; un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O y uniendo ambas partes un hetero-oligosacárido no repetitivo conocido como core o núcleo (Figura I.1).

El lípido A es la región hidrofóbica y biológicamente activa dentro de la molécula de LPS. Posee una estructura altamente conservada y es el responsable de la mayoría de las patologías severas asociadas a infecciones producidas por bacterias Gram-negativas. En *Escherichia coli* el lípido A está formado por un disacárido de D-glucosamina con seis residuos de ácidos grasos y dos grupos fosfato. El número de sustituciones de ácidos grasos parece estar en relación directa con la capacidad de inducir la respuesta inflamatoria, ya que

moléculas de LPS con cinco cadenas acilo no inducen inflamación, pudiendo incluso actuar como antagonistas (Backhed, 2003).

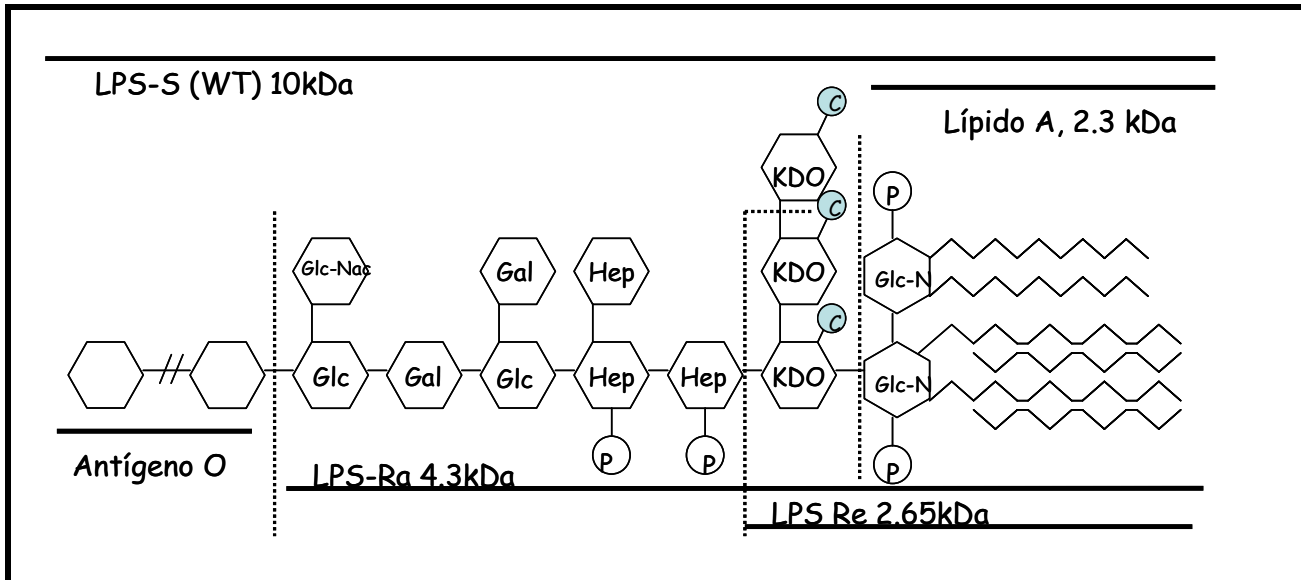


Figura I.1: Representación esquemática de la molécula de LPS.

Glc: Glucosa, Glc-Nac: N-acetil D-glucosamina, Gal: D-galactosa, Hep: 1-glicero-D-heptosa, Glc-N: D-glucosamina, P: fosfato, C: carboxilato.

El core o núcleo del LPS es una cadena corta de azúcares que puede dividirse en una región interna y una externa (Osborn, 1980). La parte interna está compuesta por un azúcar muy poco común, exclusivo de las moléculas de LPS, el ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (KDO) que se encuentra unido directamente al lípido A y un número variable de L-glicero-D-mano-heptosas. En general ambos azúcares pueden estar sustituidos con grupos fosfatos, pirofosfato, sulfato y/o etanolamina (Rivera, 1989). Las características principales de esta parte de la molécula se encuentran conservadas dentro de las Enterobacterias (Heinrichs, 1998). El núcleo externo está compuesto por un número variable de hexosas y es la porción de la molécula que presenta mayor variabilidad,

dando como resultado en el caso de *E.coli* los 5 serotipos denominados R1, R2, R3, R4 y K-12 (Rick, 1996).

El antígeno O se encuentra unido al núcleo externo y se proyecta hacia el exterior. Está compuesto por unidades repetitivas de oligosacáridos compuestos de hasta cinco monosacáridos. El largo de las cadenas puede ser muy variable, llegando a encontrarse hasta 40 repeticiones y representa la parte hidrofílica del LPS. Las variantes estructurales del antígeno O contribuyen a la presencia de diferentes serotipos entre diferentes especies e incluso dentro de la misma especie, habiéndose descrito alrededor de 170 variantes diferentes del antígeno O sólo en *Escherichia coli*.

Los LPS que contienen en su estructura las tres regiones mencionadas (lípidos A, núcleo y antígeno O) son denominados LPS completos (S-LPS) o LPS *Wild Type*. Aquellas moléculas de LPS que carecen de alguna porción se denominan R-LPS o LPS-mutantes. Hay diferentes variables de R-LPS (Ra, Rb, Rc y Rd), que carecen de antígeno O y difieren en la longitud de la porción de núcleo. El Re LPS carece por completo del *core* y sólo está compuesto por KDO y lípidos A (Figura I.1).

El LPS y el lípidos A, como moléculas anfifílicas, forman agregados en medios acuosos por encima de su concentración micelar crítica (CMC). Por debajo de este valor, las moléculas de LPS se presentan como monómeros, mientras que por encima de la CMC, los monómeros están en equilibrio con las micelas. A mayores concentraciones de LPS, los agregados anfifílicos forman agregados supramoleculares aproximadamente esféricos, los cuales pueden tener estructura multilamelar o no lamelar dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del medio (Brandenburg, 2003).

Monómeros ↔ Micelas ↔ Agregados Supramoleculares

Los agregados pueden adoptar una estructura no lamelar (cúbica Q o hexagonal invertida HII) o lamelar (L), dependiendo de la forma molecular del monómero (Brandenburg, 1993). De la estructura de los agregados puede deducirse la forma de las moléculas individuales, ya que si la molécula posee forma cónica con un área transversal de la sección hidrofóbica mayor que la correspondiente a la zona hidrofílica, formarán estructuras no lamelares invertidas en estado agregado, mientras que si las moléculas individuales poseen una forma cilíndrica, darán origen a agregados de estructura lamelar (Brandenburg, 1995), (Seydel, 1994). A su vez, la estructura de los agregados del lípido A es determinante de su bioactividad ya que modificaciones en la estructura de esta molécula, como reducción en el número de cargas o de cadenas acilo, resultan en un drástico cambio de su actividad biológica. Por ejemplo la forma hexa-acilada del lípido A presente en Enterobacterias da lugar a la formación de estructuras cúbicas mientras que formas tetra y penta-aciladas adoptan estructuras multilamelares (Schromm, 2000).

Un aparente prerrequisito para que proteínas o péptidos neutralicen el LPS es que sean capaces de cambiar la estructura de los agregados del lípido A. Esto se debe a que la activación celular por acción de la endotoxina se inicia por su interacción con proteínas como LBP y CD14, seguido de la interacción con el complejo de señalización transmembrana TLR4/MD2. Para que tengan lugar estas interacciones debe considerarse la estabilidad de los agregados, en particular la energía de unión del monómero de LPS dentro del agregado. Es posible que el monómero se una de forma más estable en agregados multilamelares que dentro de una estructura unilamelar. Por otro lado, la accesibilidad de las estructuras de reconocimiento (epitopes) de la molécula de LPS será diferente según la estructura de los agregados. En

estructuras multilamelares estos sitios estarán escondidos e inaccesibles para su unión con proteínas, en contraste a la situación en estructuras unilamelares o cúbicas.

Por último, la estructura de los agregados en sí es importante como determinante de su actividad, ya que los agregados con estructura cúbica resultantes de monómeros con forma cónica, producirán una importante distorsión en la membrana blanco luego de su incorporación y por lo tanto inducirán un estrés mecánico que se propagará a las proteínas de señalización. Por el contrario, en el caso de presentar estructuras multilamelares provenientes de monómeros de forma cilíndrica, estos no inducirán mayores distorsiones al insertarse en la estructura lamelar de la membrana de la célula blanco, por lo que no darán origen a un estrés mecánico (Seydel, 2000).

I.2- LPS y sepsis: aspectos moleculares.

En sepsis por bacterias Gram-negativas, la respuesta inflamatoria es inducida por el LPS (Bone, 1991), jugando un rol central en la iniciación y perpetuación de la inflamación sistémica.

Luego de la liberación del LPS de la membrana bacteriana durante la división celular, la muerte o en particular el tratamiento con antibióticos durante las infecciones bacterianas, la activación de las células del huésped está mediada por interacciones específicas con proteínas del suero y receptores de superficie como LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein) y CD14m, respectivamente.

El mecanismo de activación celular por LPS involucra la interacción inicial con la proteína de unión de LPS (LBP) (Tobias, 1986), (Schumann, 1990), y la formación de un complejo LPS-LBP en plasma. El complejo es reconocido por el receptor CD14 presente en la membrana celular (CD14m) o soluble en plasma (CD14s) (Wright, 1990), (Bazil, 1989),

dependiendo del tipo celular. Resultados publicados posteriormente están a favor de la participación de una forma unida a membrana de LBP en la formación de este complejo (Gutsmann, 2001).

El receptor CD14m, es una proteína de membrana anclada por medio de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que carece de dominios citoplasmáticos (Haziot, 1988). Dado que CD14m no posee dominios citoplasmáticos, se ha sugerido que el receptor de LPS es un complejo proteico multimérico que actúa como transductor de señales a través de la membrana. Se ha encontrado que este receptor es un miembro de la familia TLR (toll like receptor) (Muta, 2001).

Receptores del tipo Toll 4 (TLR4) (Backhed, 2003) son proteínas de membrana con una única región transmembrana, una región extracelular rica en residuos de leucina (Kirkland, 1996) y un tallo citoplasmático similar al del receptor de IL-1; este receptor junto a MD2 (Viriyakosol, 2000) y canales de potasio activados por stress (Blunck, 2001) forman parte del sistema multicomponente del receptor de LPS ligados a la iniciación de los eventos de señalización intracelular. Recientemente se ha propuesto que junto a los receptores anteriormente descritos, participan en el proceso de señalización inducido por LPS una compleja maquinaria de receptores concentrados en microdominios de membrana o *membrane rafts*, entre los que se puede mencionar integrinas, proteínas de shock térmico (Hsp 70 y 90), receptor de citoquina 4 (CXCR4) y factor de diferenciación 5 (GDF5) (Triantafilou, 2002).

La explicación a que diferentes respuestas o vías de señalización según el tipo celular son activadas frente a diferentes patógenos, se encuentra en la existencia de diferentes arreglos supramoleculares o *clusters* de diferente composición y de diferentes moléculas adaptadoras intracelulares (Triantafilou, 2002). Una completa revisión de la

organización y la dinámica de la compleja maquinaria de reconocimiento de LPS fue publicada por *Triantafilou, M* y *Triantafilou, K* (Triantafilou, 2005).

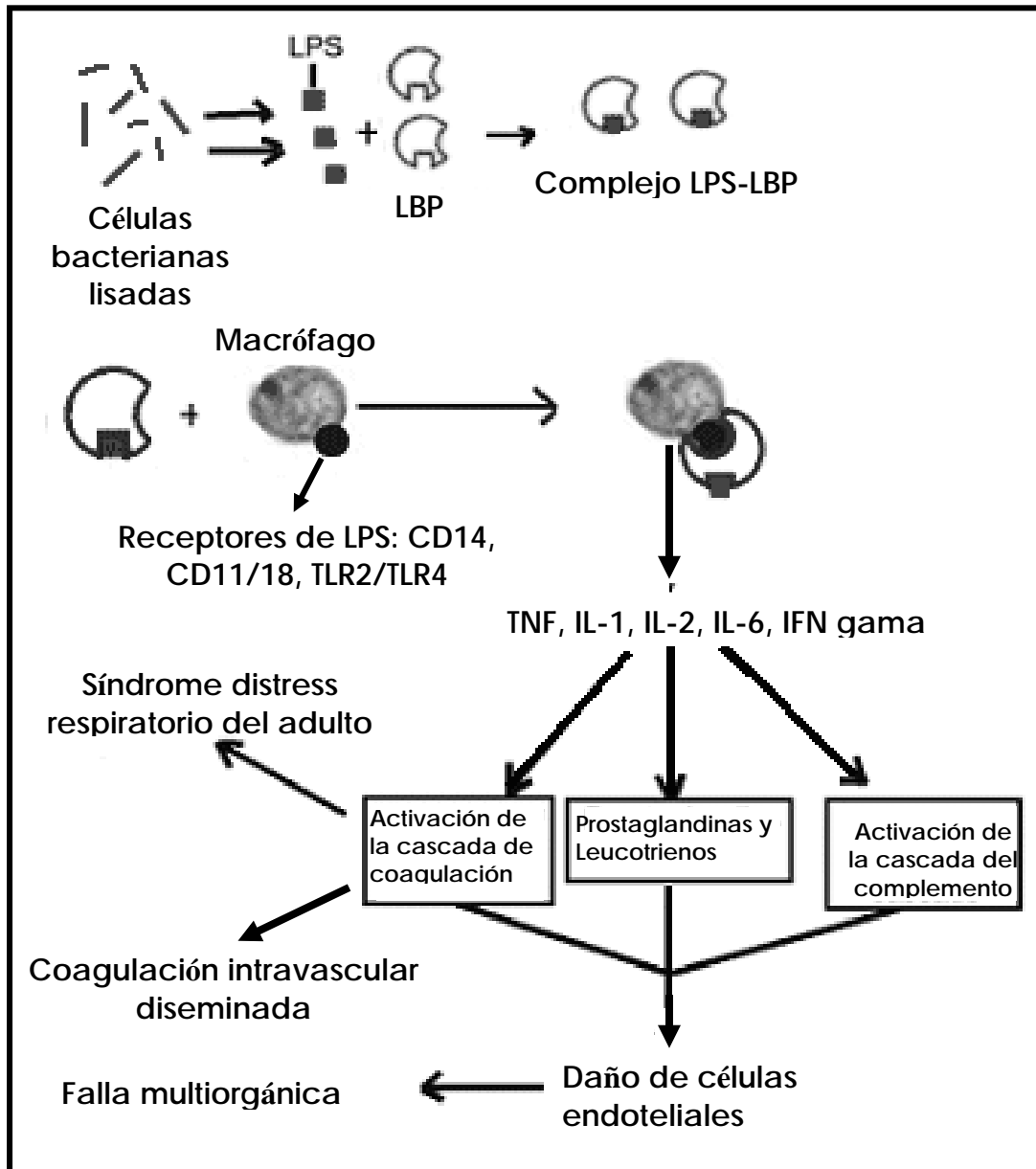


Figura I.2: Secuencia de eventos inducidos por el LPS durante la respuesta inflamatoria.

La estimulación por LPS resulta en la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) (Hatada, 2000) y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP) (Han, 1994), que llevan a la producción de proteínas inflamatorias como citoquinas, entre las que se incluyen TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 y mediadores como prostaglandinas y óxido nítrico, responsables de las respuestas patológicas a la infección como fiebre, diarrea, shock hipotensivo, coagulación intravascular generalizada y múltiples fallas orgánicas (Sweet, 1996) (Figura I.2).

I.3-Rol de la LBP en la activación-neutralización de la respuesta al LPS.

Como se expuso en la sección anterior, una vez en circulación, el LPS se une a la LBP, glicoproteína miembro de la superfamilia de proteínas que unen y transfieren fosfolípidos.

La LBP juega un rol dual en la interacción con el LPS ya que puede potenciar la estimulación celular al reconocer al LPS (Tobias, 1986), (Lamping, 1996) y transferirlo a CD14 (Wright, 1990), (Yu, 1996), o disminuir la respuesta celular al LPS por detoxificación de la endotoxina al participar en la transferencia de LPS a las HDL (High Density Lipoprotein - Lipoproteínas de Alta Densidad) (Tobias, 1986), (Wurfel, 1994) ejerciendo así, la LBP, un rol protector. A bajas concentraciones de LPS, la LBP potencia la activación celular mientras que a altas concentraciones la disminuye (Gutsmann, 2001), (Lamping, 1998).

Existe una gran controversia sobre los mecanismos de activación celular en respuesta al LPS y sobre los mecanismos de neutralización de la endotoxina, ambos mediados por LBP. Datos recientes demuestran que el rol activador de la LBP está mediado por moléculas de LBP intercaladas en membrana (Roes, 2006) y la neutralización está mediada por moléculas de LBP solubles en suero (Gutsmann, 2001).

El mecanismo de neutralización puede explicarse, en parte, por la capacidad de la LBP de transferir el LPS a lipoproteínas plasmáticas (Vesey, 2000), (Wurfel, 1994), aunque hay discrepancias sobre el mecanismo involucrado. Algunos autores describen un mecanismo en el cual la LBP facilita la difusión de moléculas de endotoxina desde micelas de LPS hacia las HDL y esto resulta en la neutralización. La transferencia de LPS hacia las HDL es un mecanismo en 2 pasos, donde el LPS es transferido a CD14s y luego desde el complejo CD14s-LPS a las HDL (Wurfel, 1997).

Otros autores demostraron que complejos LPS-LBP se unen a lipoproteínas plasmáticas resultando en la detoxificación del LPS (Levels, 2001), (de Haas, 2000). Wurfel demostró que la LBP circula en plasma asociada con HDL, modulando la unión del LPS a dichas lipoproteínas y actuando de esta manera como cofactor para la neutralización de la endotoxina (Wurfel, 1995), (Wurfel, 1994).

Se ha propuesto que la incorporación del LPS a las HDL, ya sea desde micelas de LPS o desde complejos LPS-CD14s, sería por un proceso en el cual las moléculas de LPS son intercambiadas por fosfolípidos, proceso en el que LBP, CD14 y HDL juegan un rol crucial, ejerciendo así un balance entre neutralización y activación inmune (Figura I.3).

La LBP posee alta homología de secuencia con la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) (Schumann, 1990) y con la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) (Day, 1994), las cuales se encuentran asociadas a las HDL.

El mecanismo de activación celular por LPS también involucra una interacción inicial de la endotoxina con la LBP (Tobias, 1986), (Schumann, 1990), y la formación de un complejo LPS-LBP en plasma o en membrana plasmática de la célula blanco. La LBP se une al LPS con una constante de disociación del orden de picomolar, mediando la desagregación de agregados supramoleculares de LPS para formar el complejo LPS-LBP. De

esta manera participa en la presentación del LPS hacia receptores asociados a membrana tal como CD14m, los cuales se encuentran localizados en células mieloides incluyendo monocitos y neutrófilos, iniciándose así la activación celular con la subsiguiente liberación de citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF- α), las cuales son las responsables de las respuestas patológicas (Schumann, 1990). El complejo LPS-LBP también puede interactuar con CD14s (soluble) para formar un complejo que actúa sobre células endoteliales, epiteliales y células de Kuppfer que carecen de CD14m, activando mecanismos de señalización dependientes del factor nuclear NF κ β .

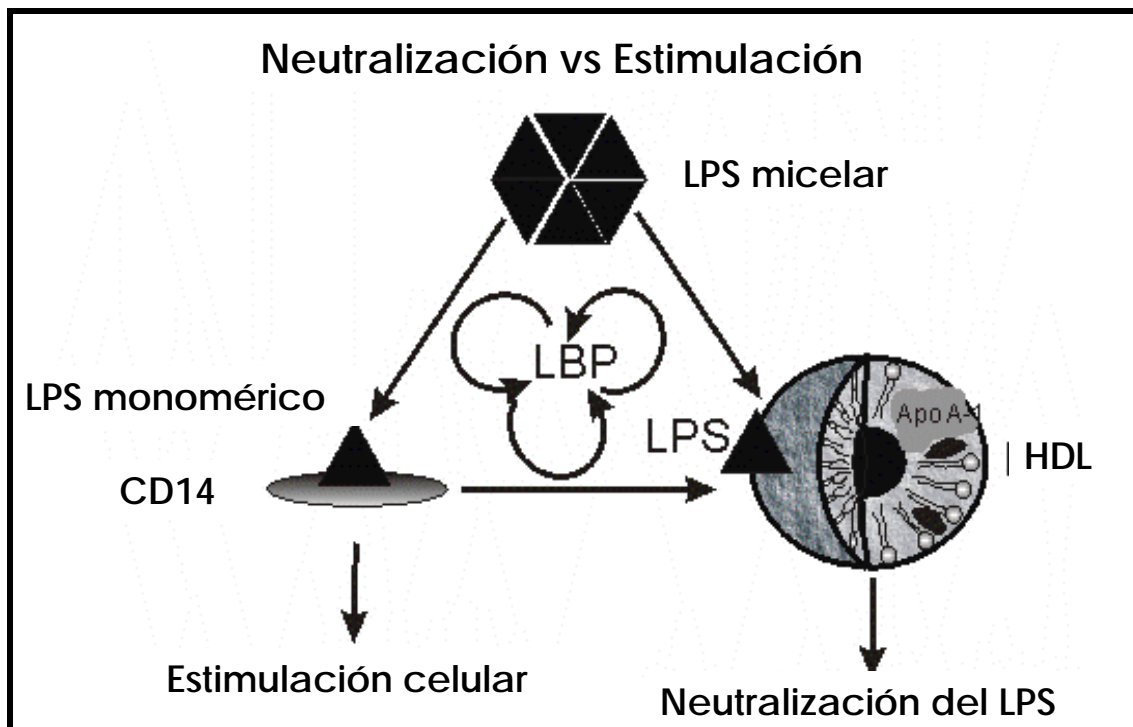


Figura I.3: Rutas neutralización del LPS y de activación celular por LPS.

La LBP se intercala en membranas (preferentemente en presencia de lípidos cargados negativamente), por medio de su porción N-terminal cargada positivamente y asume una configuración transmembrana

ubicando sus dos sitios de unión a fosfolípidos en la región hidrofóbica de la membrana (Gutsmann, 2001).

Este modelo propone que el LPS se une a la membrana cuando la LBP está intercalada en la misma y de esa forma desencadena la activación de macrófagos por LPS (Gutsmann, 2001). Para la activación es necesaria la interacción del complejo de membrana LPS-LBP con CD14m (Wright, 1990), por lo que se ha sugerido la formación de microdominios de membrana que contengan LBP, CD14 así como otras proteínas de la cascada de señalización del LPS (TLR-4 y MD-2).

En resumen, la interacción del LPS con las células blanco es dependiente de la concentración de endotoxina. A bajas concentraciones de LPS la unión de la endotoxina a la superficie celular es dependiente del receptor CD14m, y el modelo de activación celular propone que la LBP remueve monómeros de LPS desde los agregados formando un complejo LPS-LBP que interactúa con CD14m y por medio de TLR-4 y MD-2 se desencadena la respuesta celular (Hailman, 1994). En cambio, a altas concentraciones de LPS, la interacción de las moléculas de endotoxina con la membrana es independiente del receptor CD14 (Schromm, 1996). La LBP asociada a membranas une agregados de LPS y los transporta e inserta en la matriz de fosfolípidos de la membrana celular, promoviendo la activación (Schromm, 1996), (Mueller, 2005). En ambos casos la interacción es mediada por la LBP.

I.4- Rol de las lipoproteínas en la neutralización del LPS y en la modulación de la respuesta de fase aguda en la sepsis.

Se ha encontrado en estudios realizados *in vitro* que las lipoproteínas unen LPS y neutralizan sus efectos tóxicos (Brandenburg, 2002), (van Leeuwen, 2001).

Las lipoproteínas son partículas de alto peso molecular que transportan en plasma lípidos no polares, principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol. Cada partícula tiene un centro no polar el cual contiene los lípidos hidrofóbicos, y rodeando a esta parte central una monocapa de lípidos anfipáticos como fosfolípidos y colesterol no esterificado. Estas partículas también contienen proteínas específicas (apolipoproteínas) localizadas en la monocapa superficial interactuando con los fosfolípidos. Una de las clasificaciones más comúnmente empleadas de las lipoproteínas se basa en su densidad. De acuerdo a esto se dividen en 5 clases: quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y HDL.

Ya desde 1957 era conocido que la incubación del LPS con suero reducía la respuesta febril a la endotoxina en ratones (Rall, 1957). Estos resultados llevaron a realizar estudios a nivel molecular, encontrando que el LPS interactúa con componentes séricos, produciendo un desplazamiento en la densidad de las fracciones lipoproteicas debido a la formación de complejos, observando paralelamente una inhibición de la actividad tóxica del LPS (Ulevitch, 1978).

Se ha demostrado también que en plasma humano existen varias proteínas con capacidad de unir y neutralizar el LPS *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, el suero humano es capaz de prevenir la activación de monocitos inducida por el LPS mientras que suero libre de lipoproteínas pierde esta capacidad, la cual se recupera por reconstitución con lipoproteínas (Flegel, 1989).

De la fracción de lipoproteínas purificadas, HDL y LDL fueron capaces de neutralizar la actividad endotóxica del LPS (Emancipator, 1992), (Flegel, 1993), (Eggesbo, 1996). Algunos autores encontraron que el contenido de fosfolípidos y no el de colesterol de las lipoproteínas se encuentra relacionado con esta propiedad (Parker, 1995).

Estudios más recientes realizados por distintos laboratorios han demostrado que las HDL son los únicos componentes del plasma que unen y neutralizan el LPS (Brandenburg, 2002), (van Leeuwen, 2001), (Wu, 2004), mientras que las VLDL y LDL no tienen esta capacidad neutralizante (Zhang, 2003). Sin embargo en casos de sepsis severa, VLDL se convierte en el aceptor dominante de la endotoxina (Kitchens, 2003).

En cuanto a los estudios realizados *in vivo*, el pre-tratamiento con quilomicrones en ratas (Harris, 1993), VLDL y quilomicrones en ratones (Harris, 1990), HDL en conejos (Hubsch, 1995), (Cue, 1994) y fosfolípidos en cerdos (Parker, 2000) resultó en la capacidad de reducir los niveles de citoquinas e inducir una importante reducción de la mortalidad en el modelo de infecciones a Gram negativos y a LPS. Contrariamente, en ratas hipolipidémicas la mortalidad inducida por el LPS está incrementada (Feingold, 1995).

En los únicos estudios realizados en modelo de endotoxemia humana, el pre-tratamiento con HDL reduce los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-8, habiéndose asociado simultáneamente a las HDL una regulación negativa de CD14 en monocitos (Pajkrt, 1996).

I.5- HDL y sepsis.

Como se expuso anteriormente se ha encontrado que las lipoproteínas, *in vitro*, unen LPS y neutralizan su efecto tóxico. Ha sido demostrado que el aumento de los niveles circulantes de HDL provee protección en modelos animales de endotoxemia (Wurfel, 1994).

El secuestro de LPS por las lipoproteínas forma parte de un mecanismo integral de detoxificación humoral (Levels, 2001), (Northhoff, 1992), ya que la detoxificación del LPS plasmático se encuentra acelerada cuando el LPS está asociado con lipoproteínas (Qureshi, 1988).

El LPS unido a lipoproteínas es menos activo biológicamente (Emancipator, 1992), (Flegel, 1989), (Munford, 1985), (Van Lenten, 1986) debido a que la unión del LPS a lipoproteínas atenúa la liberación de citoquinas (Cavaillon, 1990).

Kitchens (Kitchens, 1999) reportó que las partículas de HDL reconstituidas (rHDL) no solo son capaces de unir LPS libre sino que también remueven LPS desde la superficie de monocitos *in vitro*. La depleción de lipoproteínas del suero da lugar a la supresión de la remoción del LPS desde los monocitos siendo esta interacción dinámica, dependiente de la concentración de CD14s. El secuestro de LPS de los monocitos coincide con la reducción de la activación celular.

En 1993 Levine (Levine, 1993) reportó por primera vez que el aumento en los niveles plasmáticos de TNF- α y la mortalidad causada por LPS es reducida en ratones transgénicos con el doble de los niveles normales de HDL circulantes. La mortalidad también fue reducida en ratones *wild-type* pre-tratados con rHDL (HDL reconstituidas) 15 minutos antes de la administración de LPS. Estos descubrimientos concuerdan con el trabajo realizado por Feingold (Feingold, 1995) quien reportó que la disminución de los valores circulantes de lipoproteínas resulta en un incremento de la mortalidad inducida por LPS en ratas. Colectivamente, estas investigaciones demuestran que las HDL endógenas son protectoras en modelos de endotoxemia.

En cuanto al componente de las HDL responsable de este efecto neutralizante, en la literatura existe gran controversia; mientras que algunos postulan que la apolipoproteína AI (componente proteico mayoritario) es el principal componente de las HDL que une y neutraliza LPS, otros están a favor que la parte lipídica es el componente que tiene un rol fundamental en este proceso.

Sin embargo, en la respuesta de fase aguda, definida como el conjunto de cambios fisiológicos y metabólicos que ocurren en respuesta a la infección o injuria de tejidos (Bayne, 2001), la síntesis hepática de proteínas involucradas en la coagulación, sistema de complemento y metabolismo de lípidos (Burger, 2002), (Liao, 2004) se encuentra alterada, con grandes cambios también en el perfil de los lípidos plasmáticos (Alvarez, 1986), (Cabana, 1989), (Gordon, 1996), en los niveles de colesterol (Schatz, 2001), lipoproteínas (Levels, 2003) y apo AI (Chenaud, 2004) los cuales se encuentran disminuidos. Es por ello que en pacientes sépticos, las concentraciones de lipoproteínas, especialmente HDL, están reducidas (Sammalkorpi, 1988). Así la modulación del metabolismo de lipoproteínas al influir en la cascada de mediadores inflamatorios en la sepsis podría prevenir las múltiples fallas orgánicas.

Como se mencionó anteriormente, las HDL son remodeladas como parte de la respuesta de fase aguda, con pérdida de apo AI y colesterol esterificado y una reducción en las enzimas LCAT, CETP, PLTP y paraxonasa asociadas a HDL. Estas moléculas son reemplazadas por amiloide sérico A (SAA), apo J y fosfolipasa A2 (Rohrer, 2004).

In vitro e *in vivo*, la proteína amiloide sérica (SAA) se asocia con HDL desplazando a la apo AI. Este proceso causa la remodelación de las HDL originando partículas de mayor densidad (HDL₃) (Cabana, 1996), (Coetzee, 1986). La presencia de SAA en las partículas de HDL reduce unas 10 veces la vida media de estas lipoproteínas en circulación. Además, el número de sitios de unión sobre los macrófagos para SSA/HDL incrementa durante la inflamación, mientras que disminuye sobre los hepatocitos. Esto sugiere que durante la fase aguda, HDL es redirigida del hepatocito al receptor *scavenger* SRB1 situado en los macrófagos, siendo este un receptor de fase no aguda de HDL (Acton, 1996). Interesantemente, el receptor *scavenger* SRBI/II es importante en la

eliminación de circulación de la endotoxina (de Winther, 2000), (Hampton, 1991). Por lo tanto, durante fase aguda, la proteína amiloide A (SAA) pasa a ser la proteína mayoritaria de las HDL, pudiendo redirigir el complejo LPS/HDL desde la ruta CD14 hacia la ruta de scavenger de macrófagos en el hígado para una rápida detoxificación.

También se ha sugerido que SAA modula la actividad biológica de LPS neutralizando su acción (Tobias, 1982), (van Leeuwen, 1998).

Las consecuencias de las propiedades biofísicas alteradas de las lipoproteínas podrían estar relacionadas con un recambio más rápido de HDL y en consecuencia con una incrementada eliminación del LPS en circulación.

Si bien, las lipoproteínas de fase aguda poseen mayor capacidad de unión y neutralización del LPS (Kitchens, 2003), esto no es suficiente para sobrellevar la marcada disminución de los niveles de lípidos y lipoproteínas encontrados en pacientes críticos.

Por ese motivo, se ha asociado la disminución de HDL durante la fase aguda con la reducción en la capacidad neutralizante del LPS durante la misma (van Leeuwen, 2003), (Wu, 2004).

Existen evidencias que demuestran que duplicando la concentración de HDL en ratones transgénicos, estos presentan una sobrevida aumentada luego de una inyección intraperitoneal de LPS. La inyección intravenosa de HDL reconstituidas (rHDL) en ratones normales también confiere protección contra el LPS (Levine, 1993). En cuanto a pruebas realizadas en humanos, la administración de rHDL en pacientes tratados con bajas dosis de LPS reduce la liberación de TNF- α , IL-6 e IL-8 y disminuye la expresión de CD14m en monocitos.

En los años recientes ha sido reportado que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) no son solo secuestrantes de LPS sino que también ejercen efectos inmunomodulatorios *in vivo*, los cuales median, al menos

en parte, los efectos beneficiosos de las HDL reportados en modelos animales de sepsis, shock hemorrágico, daño isquémico entre otros (Cockerill, 2001), (Cuzzocrea, 2004), (McDonald, 2003), (Thiemermann, 2003). Estos descubrimientos forman las bases para la hipótesis que plantea que las HDL (o lípidos con mecanismo de acción similar) pueden resultar efectivos como un nuevo enfoque terapéutico para el manejo de patologías humanas caracterizadas por inflamación sistémica o localizada.

I.6- Rol de los lípidos en la neutralización del LPS.

Como se ha mencionado anteriormente, algunos autores proponen que en la neutralización del LPS por lipoproteínas, el componente que presenta un rol fundamental son los fosfolípidos de la partícula lipoproteica (HDL) (Parker, 1995), (Wurfel, 1997). Estos autores encontraron que ni la apo A1 ni la LBP por si solas poseen capacidad neutralizante de LPS (Wurfel, 1994) y como las HDL son las lipoproteínas con mayor porcentaje de fosfolípidos, se ha propuesto que existe una correlación entre el nivel de fosfolípidos y la capacidad de unir endotoxina (Levine, 1993).

En 1994, Cue (Cue, 1994) demostró que los efectos protectores de las rHDL en modelos de endotoxemia en conejos son dependientes de la fracción de fosfatidilcolina más que del contenido de apolipoproteína. Específicamente, conejos pre-tratados con mayores relaciones molares de fosfatidilcolina que de apolipoproteína mostraron menor respuesta por TNF- α que animales que recibieron menores relaciones de fosfatidilcolina.

En 2003, Goldfarb (Goldfarb, 2003) reportó que el tratamiento con emulsiones de fosfolípidos libres de proteína (92,5% fosfolípido y 7,5% triglicérido) mejoró la función cardiopulmonar y redujo la mortalidad en

modelos porcinos de sepsis. Un patrón similar fue observado en caballos luego de la administración de LPS, en los cuales el pre-tratamiento con una emulsión de fosfolípidos atenuó la respuesta por TNF- α y redujo los niveles de leucocitos (Winchell, 2002). Posteriormente fue demostrado que la administración intravenosa de la misma emulsión libre de proteínas usada por Goldfarb (Goldfarb, 2003) atenúa la respuesta al LPS por inflamación sistémica en voluntarios sanos (Gordon, 2005).

Por lo tanto estos descubrimientos sugieren que la eficiencia de las HDL como agente terapéutico contra la inflamación sistémica es dependiente del contenido de fosfolípidos más que del componente proteico.

Han aparecido evidencias indicando que una variedad de especies lipídicas (esfingosina-1-fosfato, lisofosfatidilcolina) son individualmente protectoras en modelos de inflamación, aún cuando son administradas como post-tratamiento (Xia, 1999), (Bolick, 2005), (Garg, 2004), (Drobnik, 2003).

Las lisofosfatidilcolinas (LPC) son lípidos de particular interés ya que son protectores en modelos de sepsis y endotoxemia en ratón (Chen, 2005), (Yan, 2004). La lisofosfatidilcolina es producida por hidrólisis de fosfatidilcolina, principalmente por acción de la fosfolipasa A2 cuya presencia está regulada por el proceso inflamatorio. Aunque la lisofosfatidilcolina se asocia a LDL, las HDL pueden contribuir a los niveles circulantes de LPC por dos medios. Primero, las HDL contienen moléculas de fosfatidilcolina saturadas las cuales pueden convertirse en LPC por enzimas circulantes, como la fosfolipasa A2. Alternativamente, las HDL poseen enzimas que pueden convertir fosfatidilcolina en LPC, incluyendo LCAT, PON1 y PAF-AH. La mortalidad es atenuada cuando LPC es administrada como régimen terapéutico y es dependiente de la frecuencia y la dosis.

El tratamiento con LPC también aumenta la muerte bacteriana por incremento de la producción de peróxido de hidrógeno por los neutrófilos y reducción de su activación *in vitro* (Yan, 2004), esto marca el potencial de la LPC para inmunomodular más que simplemente actuar como un agente antiinflamatorio.

Con el fin de estudiar el rol de los lípidos en la neutralización de la endotoxina se han desarrollado experimentos en los que el LPS es incorporado en la bicapa lipídica de liposomas. Dichos experimentos demostraron que el enmascaramiento de la porción lípido A del LPS (región biológicamente activa) en matrices fosfolipídicas disminuye la potencia tóxica del LPS (Dijkstra, 1987).

La incorporación del LPS en liposomas previene la interacción de la región hidrofóbica del LPS (lípido A) con las estructuras de la membrana plasmática de la célula blanco involucradas en su activación (Dijkstra, 1987), (Dijkstra, 1988).

Cuando se exponen macrófagos a liposomas que poseen LPS incorporado en sus membranas, la interacción directa del lípido A con la membrana plasmática del macrófago se encuentra inhibida, aún cuando el liposoma se encuentre unido a la superficie celular. Estos autores observaron una reducción de la secreción de citoquinas, de la fagocitosis y de la actividad tumoricida de macrófagos (Dijkstra, 1988), (Dijkstra, 1987), apoyando la hipótesis que plantea que la interacción del lípido A con la membrana plasmática es requerida para la estimulación celular (Dijkstra, 1987).

I.7- Rol de la apolipoproteína AI (apo AI) en la neutralización.

La apolipoproteína AI (apo AI), proteína mayoritaria de HDL, tiene un rol clave en varias de las etapas del transporte reverso de colesterol (RCT).

Los efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos de las HDL han sido adjudicados a la apo AI (Shah, 2001). Además la apo AI es considerada como una proteína de fase aguda (Jahoor, 1999).

Aunque muchos estudios muestran los efectos beneficiosos de la administración de lipoproteínas en animales con endotoxemia, poco es lo que se conoce sobre el impacto de la apolipoproteína AI.

Algunos autores han presentado evidencias que la apo AI es el principal componente de las HDL con actividad anti-endotoxina, ya que une LPS y disminuye la liberación de citoquinas por los macrófagos (Ma, 2004). Existen estudios que demuestran que la administración de apo AI inhibe la liberación de TNF- α y mejora la tasa de supervivencia en ratas con endotoxemia (Imai, 2003). Se ha demostrado también que la apo AI inhibe la adhesión de los neutrófilos activados a fibronectina, el estallido oxidativo y reduce la degranulación (Liao, 2004).

Estudios recientes empleando apo-AI purificada por ultracentrifugación proponen la existencia de dos diferentes sitios de unión de LPS sobre esta proteína. Uno de ellos corresponde al dominio de unión a lípidos, el que estaría involucrado en la unión directa de LPS, mientras que el otro dominio postulado participa en la unión de la LBP, y por lo tanto en la unión indirecta de LPS (Ma, 2004).

Otros autores postulan que el efecto de la apo AI es desplazar al LPS unido a receptores de superficie de monocitos (Kitchens, 2003).

A pesar de que estos resultados sugieren que la administración de HDL o apo AI tendrían efectos beneficiosos, las cantidades terapéuticas de lipoproteínas necesarias serían impracticables (Gupta, 2005). Por este motivo, los péptidos miméticos de apo AI representan un área emergente en este campo terapéutico (Garber, 2001), (Datta, 2001), (Navab, 2004).

I.8- Estrategias para neutralizar LPS.

Las estrategias actualmente utilizadas para la neutralización del LPS emplean anticuerpos anti-LPS o anti-TNF- α que unen y neutralizan el LPS o capturan el TNF- α liberado, respectivamente. Sin embargo, estas estrategias han tenido un éxito limitado por lo que una alternativa ha sido el empleo de péptidos cargados positivamente que interactúen con LPS, como Polimixina B, NK-lisina, SAP, BPI o péptidos derivados de estas moléculas, los que serían capaces de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias.

I.8.1-Polimixina B y derivados.

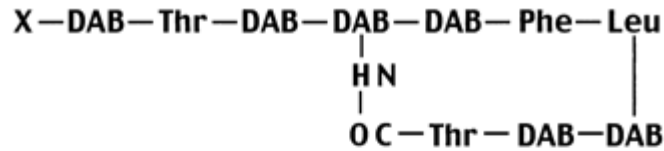
Polimixina B (PMB) es considerado el compuesto con actividad anti-endotóxica más potente. Es un oligopéptido catiónico cíclico de naturaleza anfipática ligado a un ácido graso. PMB neutraliza LPS y ha sido usado también como antibiótico de aplicación tópica. Se ha demostrado que muestra gran afinidad por el lípido A. Sin embargo, su nefrotoxicidad, neurotoxicidad y sus características farmacodinámicas y farmacocinéticas limitan su aplicación sistémica (Morrison, 1976).

PMB conjugado con dextran-70 genera PMX622 (Handley, 1993). Debido a su alto PM, el dextran limita el extravasamiento de PMB a los tejidos. Si bien PMBX622 ha superado la fase I de las pruebas no se ha demostrado aún su eficiencia en la fase II de pacientes sépticos quienes presentan fallas orgánicas. Otros derivados que se han desarrollado pero no están suficientemente caracterizados para su uso clínico son los conjugados con inmunoglobulina G (Dubrick, 1998).

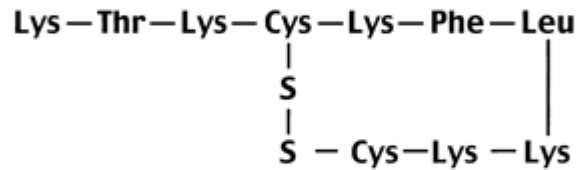
Otra serie de estudios están basados en pequeños péptidos diseñados con una estructura primaria y secundaria relacionada a PMB. Dos péptidos sintéticos derivados de la secuencia de PMB, denominados péptidos anti-endotoxina sintéticos, SAEP-2 y SAEP-4 (Figura I.4), fueron

ensayados encontrando que producen neutralización de la endotoxina, con una eficiencia similar a PMB (Iwagaki, 2000).

Polimixina B



Péptido sintético antiendotoxina-2 (SAEP-2)



Péptido sintético antiendotoxina-4 (SAEP-4)



Figura I.4: Secuencia de aminoácidos de PMB y péptidos derivados.

DAB, ácido α , γ -diaminobutírico; X, 6-metil/heptanoil-octanoil; Thr, treonina; Phe, fenilalanina; Leu, leucina; Lys, lisina; Cys, cisteína.

Con la finalidad de encontrar estructuras óptimas en cuanto a la unión del lípido A y que resulten en la detoxificación de LPS se han evaluado factores como la naturaleza catiónica y anfipática, tamaño, estructura y conformación del péptido. Se ha podido así determinar una secuencia de 8 a 13 aminoácidos las cuales son similares a las secuencias presentes en proteínas que naturalmente unen el LPS, entre ellas LBP humana y de ratón, CD14 humana, BPI y el factor anti-LPS de *Limulus*

(Porro, 1994), (Porro, 1994), (Roth, 1993), (Rustici, 1993), (Wright, 1990), (Marra, 1994), (Evans, 1995).

I.8.2- BPI (Bactericidal/Permeability Increasing Protein) / BNEP.

BPI es una proteína catiónica producida y almacenada en neutrófilos con una potente actividad anti-endotoxina y anti-citotóxica contra bacterias Gram-negativas (Weiss, 1984), (Elsbach, 1994), (Alexander, 2004). Dentro de la región N-terminal se han identificado 3 dominios separados, comprendidos entre los aa 17-45, aa 65-99 y aa 142-169, a los que se le adjudica la propiedad de unir LPS (Gray, 1989), (Kleiger, 2004), (Little, 1994). Péptidos correspondientes a estas secuencias conservan la actividad neutralizante de la endotoxina (Uknis, 1997), (Mayo, 1998).

I.8.3- Componente P Amieloide Sérico (SAP).

SAP es otra proteína presente en plasma humano con capacidad neutralizante de LPS (de Haas, 1998). Es una glicoproteína decamérica que se une a LPS con alta afinidad en presencia de bajas concentraciones de LBP, inhibiendo la inducción de la respuesta celular por LPS (de Haas, 1998). Sin embargo no es capaz de neutralizar el efecto endotóxico en presencia de suero o de altas concentraciones de LBP dado que ambas proteínas compiten por su unión a LPS (de Haas, 2000). Contrariamente a lo que se ha demostrado en el caso de LBP que interacciona con las formas monoméricas e incluso promueve la desagregación de LPS, SAP se une a las formas agregadas de LPS.

Se ha demostrado que SAP posee más de un sitio de unión a LPS y al igual que otras proteínas que unen LPS como BPI, CAP-18, CAP-37, Lactoferrina, apo B y apo E, posee un sitio de unión a heparina (Emancipator, 1992), (Rensen, 1997), (Van Berkel, 1997). Si bien tanto la

carga como el carácter hidrofóbico de los aminoácidos son factores importantes que determinan la eficiencia de unión a LPS, estos investigadores proponen que una secuencia específica de residuos para que estos péptidos posean actividad neutralizante sería esencial (de Haas, 1999).

I.8.4-NK-2.

NK-2 es un potente antibiótico de 27 residuos de aminoácidos derivados de la región central de NK-lisina, polipéptido citolítico y antimicrobiano producido por linfocitos de mamíferos (Andersson, 1995), considerado a su vez miembro de la familia de proteínas que interactúan con membranas. El tamaño molecular, carga y naturaleza anfipática de NK-2 es similar al que presentan gran número de péptidos naturales antimicrobianos que son parte del sistema inmune de una gran variedad de especies (Zasloff, 2002).

Existe una correlación entre la actividad anti-microbiana de NK-2 y la longitud de la cadena polisacarídica de LPS, resultando en una reducción en la producción de TNF- α con el acortamiento de la cadena de carbohidratos del LPS. La relativa alta afinidad de NK-2 por LPS permitiría el desplazamiento de LBP, y por lo tanto la posibilidad de neutralización de LPS *in vivo*. Por el contrario, la proteína relacionada NK-lisina, falla en neutralizar LPS *in vivo* debido a la menor afinidad por el LPS.

I.8.5- Lactoferrina.

La lactoferrina humana, glicoproteína que une hierro, es liberada por neutrófilos durante la inflamación; está involucrada en la defensa del huésped contra infecciones y en la respuesta inflamatoria excesiva, dado que interactúa con el lípido A (Japelj, 2005).

Se ha demostrado que la lactoferrina posee sitios de unión de LPS en la región N-terminal, entre los residuos 28-34. Se ha encontrado que la lactoferrina previene la unión de LPS a CD14 mediado por LBP, inhibiendo la interacción con las células. Estos autores encontraron que además de la región que involucra los aa 28-34, un *cluster* de residuos básicos entre los residuo 1-5 de lactoferrina compite con LBP por su unión a LPS (Elass-Rochard, 1998).

La capacidad de lactoferrina de limitar la unión de LPS a CD14 *in vitro* indicaría que esta proteína puede modular el proceso inflamatorio *in vivo*. Esta hipótesis está apoyada por estudios previos sobre la función protectora de la lactoferrina frente a dosis subletales de endotoxina en ratones (Zagulski, 1989). Se ha demostrado también que las infecciones bacterianas repetidas en pacientes neutropénicos puede ser reducida por tratamiento con lactoferrina (Trümpler, 1989). Además, dada la alta afinidad de la lactoferrina por el LPS, esta proteína podría neutralizar la endotoxina *in vivo*, aunque será necesario realizar estudios para investigar si esta proteína tiene la capacidad de superar la activación celular mediada por LBP y modular también la ruta de señalización de LPS independiente de CD14.

I.8.6- Péptidos miméticos de apoA-I.

El péptido denominado L-4F cuya secuencia es Ac-DWFKAFYDKVAEKFKAEAF-NH₂ (Gupta, 2005), inhibe la respuesta inflamatoria inducida por LPS y lípido A en células endoteliales humanas. Se ha propuesto que L-4F se une al lípido A evitando la unión de LPS a LBP y por lo tanto, la activación de los receptores celulares situados en células endoteliales. La interacción entre el péptido y LPS es dependiente de la naturaleza anfipática del péptido (Gupta, 2005).

Por otro lado, L-4F se une a LPS y altera su estado de agregación. En este sentido, se ha sugerido que LPS es biológicamente activo en estado agregado y es la forma de estos agregados lo que influye en la unión a LBP/CD14 (Mueller, 2004). Esto llevó a la hipótesis de que L-4F induce un cambio conformacional en el LPS alterando su estado de agregación, provocando así que el lípido A no sea accesible a LBP, previniendo de esta manera la formación del complejo y su unión a los receptores celulares

I.9- Perspectivas.

Durante los últimos 10 años se han ensayado un gran número de opciones terapéuticas contra el shock séptico basadas en el empleo de proteínas y péptidos que naturalmente unen LPS. Como se describió en las secciones anteriores, si bien los resultados obtenidos *in vitro* han sido exitosos en muchos casos, hasta el momento el balance entre la cantidad terapéutica necesaria para neutralizar el efecto endotóxico y la toxicidad *in vivo* no rinde una ecuación satisfactoria. Esta es pues la razón por la cual las perspectivas futuras están enfocadas en el desarrollo de péptidos que tengan una eficiencia incrementada en la unión del LPS, con una alta eficiencia en la eliminación del LPS o sus complejos con LBP de la circulación, vía receptores SRB1.

I.10.- Objetivos.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de este trabajo de tesis es caracterizar desde el punto de vista biofísico y biológico la interacción de LPS con membranas lipídicas y proteínas con la finalidad de dilucidar los parámetros que determinan una mayor eficiencia en el proceso de neutralización del efecto endotóxico.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1- Caracterizar desde el punto de vista biofísico el efecto del LPS sobre el proceso de micelización de membranas inducido por apo AI, por medio de técnicas espectroscópicas y de electroforesis, analizando tanto la interacción proteína-LPS como membrana-LPS.

2- Estudiar si el LPS presente en medio acuoso se asocia a membranas aún en ausencia de LBP. A su vez se evaluará si se produce una intercalación de LPS en la matriz hidrofóbica de membranas de diferente composición lipídica por medidas de la eficiencia de transferencia de energía entre derivados fluorescentes de fosfolípidos incorporados en la membrana.

3- Caracterizar por técnicas de microscopía bifotónica empleando la sonda fluorescente Laurdan la formación de dominios de LPS incorporado en la membrana.

4- Caracterizar la interacción de apo AI-LPS evaluando los cambios conformacionales de la proteína por medidas de fluorescencia intrínseca, los parámetros característicos del proceso de desnaturalización por cloruro de guanidinio y el proceso de digestión triptica. Finalmente, por uso de reactivos fotoactivables y digestión química con bromuro de cianógeno se determinará la mínima región de la proteína que interacciona con LPS.

5- Evaluar mediante ELISA la capacidad de reducir la producción de citoquinas (TNF- α) por parte de liposomas, apo AI y el mínimo fragmento de apo AI que une LPS.

I.11- Bibliografía.

- Acton, S, Rigotti, A, Landschulz, K, *et al.* Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271 (1996), 518-520.
- Alexander, S, Bramson, J, Foley, R, *et al.* Protection from endotoxemia by adenoviral-mediated gene transfer of human bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood* 103 (2004), 93-99.
- Alvarez, C, Ramos, A. Lipids, lipoproteins and apoproteins in serum during infection. *Clin. Chem.* 32 (1986), 142-145.
- Andersson, M, Gunne, H, Agerberth, B, *et al.* NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J.* 14 (1995), 1615-1625.
- Backhed, F, Normark, S, Schweda, E, *et al.* Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect.* 5 (2003), 1057-1063.
- Bayne, C, Gerwick, L. The acute phase response and innate immunity of fish. *Development and Comparative Immunology.* 25 (2001), 725-743.
- Bazil, V, Baudys, M, Hilgert, I, *et al.* Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein-CD14. *Mol. Immunol.* 26 (1989), 655-662.
- Blunck, R, Scheel, O, Muller, M, *et al.* New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvements of a K⁺ channel in transmembrane signaling. *J. Immunol.* 166 (2001), 1009-1015.
- Bolick, D, Srinivasan, S, Kim, K, *et al.* Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor-alpha-mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. *Atheroscler. Thrombos. Vascul. Biol.* 25 (2005), 976-981.

- Bone, R. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Inter. Med.* 115 (1991), 457-469.
- Brandenburg, K, Andra, J, Muller, M, *et al.* Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydr. Res.* 338 (2003), 2477-2489.
- Brandenburg, K, Jurgens, G, Andra, J, *et al.* Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002), 5972-5981.
- Brandenburg, K, Mayer, H, Koch, M, *et al.* Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 218 (1993), 555-563.
- Brandenburg, K, Schromm, A, Koch, M, *et al.* Conformation and fluidity of endotoxins as determinants of biological activity. In *Bacterial Endotoxins: Lipopolysaccharides from Genes to Therapy* (Levin, J, Alving, CR, Munford, RS & Redl, H, eds) John Wiley & Sons, New York, USA. (1995), 167-182.
- Burger, D, Dayer, J. High density lipoprotein associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmunity Reviews* 1 (2002), 111-117.
- Cabana, V, Lukens, J, Rice, K, *et al.* HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. *J. Lipids Research.* 37 (1996), 2662-2674.
- Cabana, V, Siegel, J, Sabesin, S. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 30 (1989), 39-49.
- Cavaillon, J, Fitting, C, Haeffner-Cavaillon, N, *et al.* Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infection and Immunity.* 58 (1990), 2375-2382.
- Cockerill, G, McDonald, M, Mota-Filipe, H, *et al.* High density lipoproteins reduce organ injury and organ dysfunction in a rat model of hemorrhagic shock. *FASEB J* 15 (2001), 1941-1952.

- Coetzee, G, Strachan, A, van der Westhuyzen, D, *et al.* Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size and apolipoprotein composition. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 9644-9651.
- Cue, J, DiPiro, J, Brunner, L, *et al.* Reconstituted high density lipoprotein inhibits physiologic and tumor necrosis factor alpha responses to lipopolysaccharide in rabbits. *Arch. Surg.* 129 (1994), 193-197.
- Cuzzocrea, S, Dugo, L, Patel, N, *et al.* High-density lipoproteins reduce the intestinal damage associated with ischemia/reperfusion and colitis. *Shock* 21 (2004), 342-351.
- Chen, G, Li, J, Qiang, X, *et al.* Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine: an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res* 46 (2005), 623-637.
- Chenaud, C, Merlani, P, Roux-Lombard, P, *et al.* Low apolipoprotein A-I level at ICU admission and SIRS exacerbation. *Crit. Care Med.* 32 (2004), 632-637.
- Datta, G, Chaddha, M, Hama, S, *et al.* Effects of increasing hydrophobicity on the physical-chemical and biological properties of a class A amphipathic helical peptide. *J. Lipid Res.* 42 (2001), 1096-1104.
- Day, J, Albers, J, Lofton-Day, C, *et al.* Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 9388-91.
- de Haas, C, Haas, P, Van Kessel, K, *et al.* Affinities of different proteins and peptides for lipopolysaccharide (LPS) as determined by biosensor technology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998), 492-496.
- de Haas, C, Poppelier, M, van Kessel, K, *et al.* Serum amyloid P component prevents high-density lipoprotein-mediated neutralization of lipopolysaccharide. *Infectious Immunology* 68 (2000), 4954-4960.
- de Haas, C, Van der Tol, M, Van Kessel, K, *et al.* A synthetic lipopolysaccharide (LPS)-binding peptide based on amino acids 27-39 of

serum amyloid P component inhibits LPS-induced responses in human blood. *J. Immunol.* 161 (1998), 3607-3615.

-de Haas, C, van der Zee, R, Benaissa-Trouw, B, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Synthetic Peptides Derived from Serum Amyloid P Component Neutralize LPS. *Infection and Immunity.* (1999), 2790-2796.

-de Haas, C, van Leeuwen, H, Verhoef, J, *et al.* Analysis of lipopolysaccharide (LPS)-binding characteristics of serum components using gel filtration of FITC-labeled LPS. *J. Immunol. Methods* 242 (2000), 79-89.

-de Winther, M, van Dijk, K, Havekes, L, *et al.* Macrophage scavenger receptor class A. A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Atheroscler. Thrombos. Vascul. Biol.* 20 (2000), 290-297.

-Dijkstra, J, Larrick, J, Ryan, J, *et al.* Incorporation of LPS in liposomes diminishes its ability to induce tumoricidal activity and tumor necrosis factor secretion in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 43 (1988), 436-444.

-Dijkstra, J, Mellors, J, Ryan, J, *et al.* Modulation of the biological activity of bacterial endotoxin by incorporation into liposomes. *The Journal of immunology.* 138 (1987), 2663-2670.

-Drobnik, W, Liebisch, G, Audebert, F, *et al.* Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J Lipid Res* 44 (2003), 754-761.

-Dubrick, J, Bhattacharjee, A, Hoover, D, *et al.* Covalent Polymyxin conjugates with human immunoglobulin G as an anti-endotoxin reagent. *Antimicrobial Agents Chemother.* 42 (1998), 583-588.

-Eggesbo, J, Hjerman, I, Hostmark, A, *et al.* LPS induced release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in EDTA or heparin anticoagulated whole blood from persons with high or low levels of serum HDL. *Cytokine* 8 (1996), 152-160.

- Elass-Rochard, E, Legrand, D, Salmon, V, *et al.* Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infection and Immunity*. 66 (1998), 486-491.
- Elsbach, P. Bactericidal permeability-increasing protein in host defense against gram-negative bacteria and endotoxin. *Ciba Found. Symp.* 186 (1994), 176-187.
- Emancipator, K, Csako, G, Elin, R. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoprotein and apolipoprotein. *Infection and Immunity*. 60 (1992), 596-601.
- Evans, T, Carpenter, A, Moyes, D, *et al.* Protective effects of a recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in an animal model of gram-negative sepsis. *J. Infect. Dis.* 171 (1995), 153-160.
- Feingold, K, Funk, J, Moser, A, *et al.* Role for circulating lipoproteins in protection from endotoxin toxicity. *Infection and Immunity*. 63 (1995), 2041-2046.
- Flegel, W, Baumstark, M, Weinstock, C, *et al.* Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low and high density lipoproteins and by apolipoprotein AI. *Infection and Immunity*. 61 (1993), 5140-5146.
- Flegel, W, Wolp, A, Mannel, D, *et al.* Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins. *Infection and Immunity*. 57 (1989), 2237-2245.
- Garber, D, Datta, G, Chaddha, M, *et al.* A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet induced atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 42 (2001), 545-552.
- Garg, S, Volpe, E, Palmieri, G, *et al.* Sphingosine-1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 189 (2004), 2129-2138.

- Goldfarb, R, Parker, T, Levine, D, *et al.* Protein-free phospholipid emulsion treatment improved cardiopulmonary function and survival in porcine sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284 (2003), R550-R557.
- Gordon, B, Parker, T, Levine, D, *et al.* Neutralization of endotoxin by a phospholipid emulsion in healthy volunteers. *J. Infect. Dis.* 191 (2005), 1515-1522.
- Gordon, B, Parker, T, Levine, D, *et al.* Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit. Care Med.* 24 (1996), 584-589.
- Gray, P, Flaggs, G, Leong, S, *et al.* Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. *J. Biol. Chem.* 264 (1989), 9505-9509.
- Gupta, H, Dai, L, Datta, G, *et al.* Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses by an Apolipoprotein AI Mimetic Peptide. *Circ. Res.* 97 (2005), 236-243.
- Gutsmann, T, Haberer, N, Carroll, S, *et al.* Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol. Chem.* 382 (2001), 425-434.
- Gutsmann, T, Müller, M, Carroll, S, *et al.* Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infection and Immunity.* 69 (2001), 6942-6950.
- Hailman, E, Lichenstein, H, Wurfel, M, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* 179 (1994), 269-277.
- Hampton, R, Golenbock, D, Penman, M, *et al.* Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352 (1991), 342-344.

- Han, J, Lee, J, Bibbs, L, *et al.* A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265 (1994), 808-811.
- Handley, D, Lake, P. Polymixin B conjugates. US patent 5177059 (1993).
- Harris, H, Grunfeld, C, Feingold, K, *et al.* Human very low density lipoproteins and chylomicrons alter the fate of endotoxin decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J. Clin. Invest.* 86 (1990), 696-702.
- Harris, H, Grunfeld, C, Feingold, K, *et al.* Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J. Clin. Invest.* 91 (1993), 1028-1034.
- Hatada, E, Krappmann, D, Scheidereit, C. NF- κ B and the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2000), 52-58.
- Haziot, A, Chen, S, Ferrero, E, *et al.* The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* 141 (1988), 547-552.
- Heinrichs, D, Yethon, J, Whitfield, C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 30 (1998), 221-232.
- Hubsch, A, Casas, A, Doran, J. Protective effects of reconstituted high-density lipoprotein in rabbit gram negative bacteremia models. *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995), 548-558.
- Imai, T, Fujita, T, Yamazaki, Y. Beneficial effects of Apolipoprotein A-I on endotoxemia. *Surgery Today* 33 (2003), 684-687.
- Iwagaki, A, Porro, M, Pollack, M. Influence of synthetic antiendotoxin peptides on lipopolysaccharide (LPS) recognition and LPS-induced proinflammatory cytokine responses by cells expressing membrane-bound CD14. *Infection and Immunity.* 68 (2000), 1655-1663.

- Jahoor, F, Gazzard, B, Phillips, G, *et al.* The acute-phase protein response to human immunodeficiency virus infection in human subjects. *Am. J. Physiol.* 276 (1999), E1092-E1098.
- Japelj, B, Pristovsek, P, Majerle, A, *et al.* Structural origin of endotoxin neutralization and antimicrobial activity of a lactoferrin-based peptide. *J. Biol. Chem.* 280 (2005), 16955-16961.
- Kirkland, T, Fierer, J. Coccioidomycosis: a reemerging infectious disease. *Emerg. Infect. Dis.* 2 (1996), 192-199.
- Kitchens, R, Thompson, P. Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins. *Journal of Endotoxin Research* 9 (2003), 113-118.
- Kitchens, R, Thompson, P, Munford, R, *et al.* Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 44 (2003), 2339-2348.
- Kitchens, R, Wolfbauer, G, Albers, J, *et al.* Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J Biol Chem.* 274 (1999), 34116-34122.
- Kleiger, G, Beamer, L, Grothe, R, *et al.* The 1.7 Å crystal structure of BPI: a study of how two dissimilar amino acid sequences can adopt the same fold. *J. Mol. Biol.* 299 (2004), 1019-1034.
- Lamping, N, Dettmer, R, Schröder, N, *et al.* LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J. Clin. Invest.* 101 (1998), 2065-2071.
- Lamping, N, Hoess, A, Yu, B, *et al.* Effects of site directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS) binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J. Immunol.* 157 (1996), 4648-4656.

- Levels, J, Abraham, P, van den Enda, A, *et al.* Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infection and Immunity*. 69 (2001), 2821-2828.
- Levels, J, Lemaire, L, van den Ende, A, *et al.* Lipid composition and lipopolysaccharide binding capacity of lipoproteins in plasma and lymph of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure. *Crit. Care. Med*. 31 (2003), 1647–1653.
- Levine, D, Parker, T, Donnelly, T, *et al.* In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 90 (1993), 12040 -12044.
- Liao, X, Ma, J, Lou, B, *et al.* Alteration of the components in serum high density lipoprotein during the acute phase reaction induced by lipopolysaccharide. *Fudan University Journal of Medical Sciences*. 31 (2004).
- Little, R, Kelner, D, Lim, E, *et al.* Functional domains of recombinant bactericidal/ permeability increasing protein (rBPI23). *J. Biol. Chem*. 269 (1994), 1865-1872.
- Ma, J, Liao, X, Lou, B, *et al.* Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Biochim. Biophys. Acta Sin (Shanghai)*. 36 (2004), 419-424.
- Marra, M, Au-Young, J, Lin, L, *et al.* Identification of bactericidal/permeability increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) domains which are important for LPS neutralizing or transducing activity and circulating half-life. *J. Endotoxin Res*. 1 (1994), 18.
- Mayo, K, Haseman, J, Ilyina, E, *et al.* Designed beta-sheet-forming peptide 33 mers with potent human bactericidal/permeability increasing protein-like bactericidal and endotoxin neutralizing activities. *Biochim. Biophys. Acta* 1425 (1998), 81-92.

- McDonald, M, Dhady, P, Cockerill, G, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* 20 (2003), 551-557.
- Morrison, D, Jacobs, D. Binding of polymixin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 13 (1976), 813-818.
- Mueller, M, Lindner, B, Dedrick, R, *et al.* Endotoxin: physical requirements for cell activation. *J. Endotoxin Res.* 11 (2005), 299.
- Mueller, M, Lindner, B, Kusumoto, S, *et al.* Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 26307-26313.
- Munford, R, Dietschy, J. Effects of specific antibodies, hormones and lipoproteins on bacterial lipopolysaccharides injected into rat. *J. Infect. Dis.* 152 (1985), 177-184.
- Muta, T, Takeshige, K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4. Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *European Journal of Biochemistry.* 268 (2001), 4580-4589.
- Navab, M, Anantharamaiah, G, Reddy, S, *et al.* Human apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptide: potential for atherosclerosis reversal. *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (2004), 645- 649.
- Northhoff, H, Flegel, W, Yurttas, R, *et al.* The role of lipoproteins in the inactivation of endotoxin by serum. *Infus. Ther.* 19 (1992), 202-203.
- Osborn, M, Wu, H. Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 34 (1980), 493-507.
- Pajkrt, D, Doran, J, Koster, F, *et al.* Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J. Exp. Med.* 184 (1996), 1601-1608.
- Parker, T, Levine, D, Chang, J, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infection and Immunity.* 63 (1995), 253-258.

- Parker, T, Levine, D, Gordon, B, *et al.* Phospholipid rich emulsion improved survival and cardiovascular status in porcine septic shock in a dose-dependent manner. *Cri. Care. Med.* 27. A158, Suppl 12 (2000).
- Porro, M. Cyclic or linear conformations of sequences binding lipid A: does it really matter? *Trends Microbiol.* 2 (1994), 338-9.
- Porro, M. Structural basis of endotoxin recognition by natural polypeptides. *Trends Microbiol.* 2 (1994), 65-66.
- Qureshi, N, Takayama, K, Mascagni, P, *et al.* Complete structural determination of lipopolysaccharide obtained from deep rough mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 11971-11976.
- Rall, D, Gaskin, J, Kelley, M. Reduction of febrile response to bacterial polysaccharide following incubation with serum. *Am. J. Physiol.* 188 (1957), 559-562.
- Rensen, P, Oosten, M, Bilt, E, *et al.* Human recombinant apolipoprotein E redirects lipopolysaccharide from Kupffer cells to liver parenchymal cells in rats in vivo. *J. Clin. Investig.* 99 (1997), 2438-2445.
- Rick, P, Silver, R. Enterobacterial Common Antigen and Capsular Polysaccharides. *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Segunda Edición. ASM Press. Washington DC. (1996), Cap 9.
- Rivera, M, Mcgroarty, E. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 171 (1989), 2244-2248.
- Roes, S, Mumm, F, Seydel, U, *et al.* Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy. *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 2757-2763.
- Rohrer, L, Hersberger, M, von, E. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (2004), 269-278.

- Roth, R, Tobias, P. Lipopolysaccharide-binding proteins of *Limulus* amoebocyte lysate. *Infection and Immunity*. 61 (1993), 1033-1039.
- Rustici, A, Velucchi, M, Faggioni, R, *et al.* Molecular mapping and detoxification of the lipid A binding site by synthetic peptides. *Science* 259 (1993), 361-365.
- Sammalkorpi, K, Valtonen, V, Kertula, Y, *et al.* Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism*. 37 (1988), 859-865.
- Schatz, I, Masaki, K, Yano, K, *et al.* Cholesterol and all-cause mortality in elderly people from the Honolulu Heart Program: a cohort study. *Lancet* 358 (2001), 351–355.
- Schromm, A, Brandenburg, K, Loppnow, H, *et al.* Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem*. 267 (2000), 2008-2013.
- Schromm, A, Brandenburg, K, Rietschel, E, *et al.* Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Letters*. 399 (1996), 267-271.
- Schumann, R, Leong, S, Flaggs, G, *et al.* Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249 (1990), 1429-1431.
- Seydel, U, Brandenburg, K, Rietschel, E. A case for an endotoxic conformation. *Prog. Clin. Biol. Res*. 388 (1994), 17-30.
- Seydel, U, Oikawa, M, Fukase, K, *et al.* Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur. J. Biochem*. 267 (2000), 3032-3039.
- Shah, P, Kaul, S, Nilsson, J, *et al.* Exploiting the vascular protective effects of high density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation*. 104 (2001), 2376-2383.

- Sweet, M, Hume, D. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 60 (1996), 8-26.
- Thiemermann, C, Patel, N, Kvale, E, *et al.* High density lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003), 1833-1843.
- Tobias, P, McAdam, K, Ulevitch, R. Interactions of bacterial lipopolysaccharide with acute-phase rabbit serum and isolation of two forms of rabbit serum amyloid A. *J. Immunol.* 128 (1982), 1420-1427.
- Tobias, P, Soldau, K, Ulevitch, R. Isolation of a lipopolysaccharide binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164 (1986), 785-793.
- Triantafyllou, M, Triantafyllou, K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin Res.* 11 (2005), 5-11.
- Triantafyllou, M, Triantafyllou, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23 (2002), 301-304.
- Trümpler, U, Straub, P, Rosenmund, A. Antibacterial prophylaxis with lactoferrin in neutropenic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8 (1989), 310-313.
- Uknis, M, Wasiluk, K, Acton, R, *et al.* Design of a potent novel endotoxin antagonist. *Surgery Today* 122 (1997), 380-385.
- Ulevitch, R, Johnston, A. The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolisaccharides by serum. *J. Clin. Invest.* 62 (1978), 1313-1324.
- Van Berkel, P, Geerts, M, van Veen, H, *et al.* N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* 328 (1997), 145-151.
- van Leeuwen, H, Heezius, E, Dallinga, G, *et al.* Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 31 (2003), 1359 -1366.

- van Leeuwen, H, van Beek, A, Dalliga-Thie, G, *et al.* The role of high density lipoprotein in sepsis. *The Netherlands Journal of Medicine.* 59 (2001), 102-110.
- van Leeuwen, H, van Isterdael, M, van Strijp, J, *et al.* The role of serum amyloid A in sepsis and LPS neutralization. *Crit. Care Med.* 26: A130 (1998),
- Van Lenten, B, Fogelman, A, Haberland, M, *et al.* The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), 2704–2708.
- Vesny, C, Kitchens, R, Wolfbauer, G, *et al.* Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infection and Immunity.* 68 (2000), 2410-2417.
- Viriyakosol, S, Kirkland, T, Soldau, K, *et al.* MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J. Endotoxin Res.* 6 (2000), 489-491.
- Weiss, J, Muello, K, Victor, M, *et al.* The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope. *J. Immunol.* 132 (1984), 3109-3115.
- Winchell, W, Hardy, J, Levine, D, *et al.* Effect of the administration of a phospholipid emulsion on the initial response of horses administered endotoxin. *Am J Vet Res* 63 (2002),
- Wright, S, Ramos, R, Tobias, P, *et al.* CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 (1990), 1431-1433.
- Wu, A, Hinds, C, Thiemermann, C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 21 (2004), 210-221.
- Wurfel, M, Hailman, E, Wright, S. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J. Exp. Med.* 181 (1995), 1743-1754.

- Wurfel, M, Kunitake, S, Lichenstein, H, *et al.* Lipopolysaccharide-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J. Exp. Med.* 180 (1994), 1025-1035.
- Wurfel, M, Wright, S. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers. *The Journal of immunology.* 158 (1997), 3925-3934.
- Xia, P, Vadas, M, Rye, K, *et al.* High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem.* 274 (1999), 33143-33147.
- Yan, J, Jung, J, Lee, J, *et al.* Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat. Med.* 10 (2004), 161-167.
- Yu, B, Wright, S. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein (LBP). Transfer of LPS to soluble CD14. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 4100-4105.
- Zagulski, T, Lipiński, P, Zagulska, A, *et al.* Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection in vivo. *Br. J. Exp. Pathol.* 70 (1989), 697-704.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415 (2002), 389-395.
- Zhang, H, Wu, M, Lou, B, *et al.* Role of high density lipoprotein in protecting against endotoxin toxicity. *Fudan University Journal of Medical Sciences.* 30 (2003), 474-476.

Capítulo II: Materiales y Métodos Generales.

Capítulo II: Materiales y métodos generales.

II.1-Lipopolisacáridos.

Los tipos de lipopolisacáridos utilizados en este trabajo de tesis fueron: LPS completo (S-LPS) de *E.coli* 0111:B4, LPS derivatizado con FITC (FITC-LPS) de *E. coli* 0111:B4, lípido A difosforilado de *E. coli* F583 (mutante Rd-LPS), todos provistos por Sigma-Aldrich.

II.2- Purificación de apo-AI.

La apo AI se purificó según Tricerri (Tricerri, 1998) a partir de la fracción HDL de plasma humano, donado por el Banco de Sangre del Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina.

Las lipoproteínas se obtuvieron por flotación, a partir de plasma humano, agregando bromuro de sodio sólido (NaBr) hasta llegar a una densidad de 1,21 gr/ml y ultracentrifugación a 55.000 rpm durante 44 horas a 10°C en un rotor 70 Ti (Beckman). De la fracción de lipoproteínas se separaron las HDL en una columna Sephacryl S300, eluyendo con buffer 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.01% azida sódica, pH 8. La fracción de HDL colectada fue dializada contra buffer 5 mM EDTA (usando membranas de diálisis de 12.000 Da de corte). Luego de la diálisis las HDL fueron delipidizadas en 6M GndHCl a 37°C con agitación suave, durante 3 horas. Luego se dejó reposar en hielo por 10 minutos y se dializó contra buffer 5 mM EDTA pH 7.4. Una vez dializada, la muestra se llevó a densidad 1.21 g/ml con NaBr, se ultracentrifugó a 50.000 rpm durante 24 horas a 10°C, se colectó la capa inferior del tubo y se dializó contra 5 mM CO₃NH₄. Por último, la muestra se liofilizó y resuspendió en buffer 10 mM Tris, 3M GndHCl, 1% β-mercaptoetanol.

La purificación de apo AI se realizó por filtración en gel en columna Superdex 200 10/30HR a un flujo de 0.5 ml/min, utilizando para la elución buffer 10 mM Tris, 3M GndHCl, 1% β-mercaptoetanol. El

principal contaminante de la apo AI es la apo AII, ya que debido a que sus pesos moleculares son cercanos pueden coeluir. La apo AII está formada por dos cadenas de 8.500 Da unidas por un puente disulfuro. La presencia de β -mercaptoetanol en el buffer de elución tiene como objetivo reducir el puente disulfuro, separando los dos péptidos, retrasando su elución y permitiendo de esa manera la mejor purificación de la apo AI. La apo AI purificada se dializó contra 0.01% EDTA pH 7.5, se liofilizó y se almacenó a -80°C .

La pureza se analizó por SDS-PAGE 12%. Previo a su utilización la apo AI es resuspendida en buffer A (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

III.3- Cuantificación de proteínas: Método de Lowry.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry, 1951). El método consta de una reacción colorimétrica que implica en un primer paso la formación de un complejo cobre-proteína en medio alcalino. Este complejo posteriormente reduce al reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico-fosfowolfrámico) produciendo una coloración azul, proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos presentes en el tubo.

La intensidad de color se cuantificó a 750 nm en un espectrofotómetro SLM Aminco DW 2000.

En cada determinación se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón.

II.4- Electroforesis.

Las proteínas son moléculas que poseen carga a cualquier pH diferente al del punto isoeléctrico, por lo tanto pueden migrar en un campo eléctrico. La tasa de migración de las proteínas dependerá de su densidad de carga (relación carga/masa), su forma y de la viscosidad del medio en el cual se mueve. Por lo tanto estableciendo las condiciones de pH y fuerza iónica, al aplicar un campo eléctrico a una

mezcla de proteínas, cada una de ellas migrará a diferente velocidad hasta una única posición dentro del campo eléctrico determinado.

II.4.1- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Los geles de poliacrilamida son el soporte utilizado para la separación de proteínas por electroforesis. Los geles resultan de la polimerización de monómeros de acrilamida en largas cadenas y el *crosslinking* de las mismas por compuestos bifuncionales, como la bisacrilamida. La polimerización de la acrilamida es iniciada por el agregado de persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED), aceleradores del proceso. Este soporte combina el efecto tamiz molecular y movilidad eléctrica. El tamaño de poro de los geles de poliacrilamida depende de la concentración total de acrilamida en la mezcla de polimerización. La elección de la concentración de acrilamida es crítica para la separación óptima de las proteínas.

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede realizarse en condiciones desnaturalizantes utilizando como agente disociante el detergente iónico Dodecilsulfato de Sodio (SDS). La mezcla de proteínas se desnaturaliza a 100°C en presencia de un exceso de SDS y β -mercaptoetanol (que cliva los puentes disulfuro). Bajo estas condiciones el SDS se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos de la cadena polipeptídica. De esta manera la carga intrínseca de la proteína es insignificante comparada con la carga negativa otorgada por el detergente unido, por lo tanto los complejos SDS-polipéptido tienen carga neta negativa proporcional a su masa y migran en los geles de poliacrilamida según su tamaño. Así se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína, por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos.

El método de electroforesis utilizado fue el de Laemmli (Laemmli, 1970). Se trata de un sistema vertical discontinuo que consiste en dos geles contiguos pero distintos: el gel separador por debajo y el gel de siembra por encima. Ambos tienen diferente diámetro de poro, pH y fuerza iónica. Esta discontinuidad actúa concentrando grandes volúmenes de muestra en el gel de siembra, resultando en una mayor resolución final. Se utilizó un gel de siembra al 4% p/v de acrilamida (malla de poro no limitante). Los distintos geles separadores utilizados a lo largo del trabajo de tesis fueron de 0,75 mm de espesor y 10%, 12,5% y 17% p/v de acrilamida. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (100 ó 120 mV). Se empleó una cuba electrofóretica Mini Protean II, Bio Rad, con una fuente de poder Power 200-2.0, Bio Rad. Para la determinación de los pesos moleculares se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (LMW calibration kit for SDS electrophoresis, Amersham).

II.4.2- Electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente en condiciones nativas (PAGGE).

La electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturizantes permite fraccionar las proteínas manteniendo las interacciones entre subunidades, la conformación nativa y la actividad biológica. Durante la electroforesis en condiciones nativas, la separación de las proteínas ocurre según las diferencias de tamaño y carga de las moléculas.

En los geles en gradiente, la concentración de acrilamida aumenta, y por ende el poro disminuye en la dirección de migración de las proteínas. Este tipo de geles permite fraccionar proteínas en un amplio rango de pesos moleculares. En este trabajo de tesis los geles de poliacrilamida nativos en gradiente 4-25% (PAGGE) fueron utilizados para el análisis de las partículas formadas durante el proceso de micelización.

II.4.3- Electroforesis en sistemas de geles Tris-Tricina.

Estos geles son utilizados para la separación de proteínas de bajo peso molecular debido a que poseen mayor resolución que los geles Tris-Glicina. Este tipo de geles utiliza Tricina en lugar de Glicina como *trailing ion* y posee además de los geles de siembra y de resolución un gel intermedio denominado espaciador, donde las proteínas experimentan un segundo proceso de separación para permitir mejor resolución de las proteínas de bajo peso molecular (Schägger, 1987).

En este trabajo de tesis este tipo de geles fue utilizado para la separación y análisis de los fragmentos obtenidos por proteólisis de apo A1 con CNBr.

II.5- Tinción de proteínas.

El perfil de proteínas sometidas a electroforesis se visualizó por tinción con Coomassie blue o tinción con plata, (Oakley, 1980).

II.6- Western Blot.

Por la técnica de *Western Blot* se puede detectar una proteína específica a partir de una mezcla de proteínas.

Proteínas lo suficientemente separadas en SDS-PAGE pueden ser transferidas a una membrana sólida de nitrocelulosa, aplicando una corriente eléctrica al gel (100 mV, 1h) de manera que se transfieran las proteínas a la membrana con el mismo patrón de separación logrado en el SDS-PAGE. Todos los sitios en la membrana que no contienen proteína transferida del gel tienen que ser bloqueados para que el primer anticuerpo no se fije de manera inespecífica, dando falsos positivos. El bloqueo se realizó con una solución 3% (m/v) de leche descremada disuelta en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150mM, pH= 7.4 (TBS bloqueo), durante 2 hs con agitación suave continua.

Para detectar el antígeno transferido a la membrana se agregó el primer anticuerpo (anti-apo A1 obtenido en conejo) en la dilución adecuada (1/3000) en TBS, durante toda la noche a 4°C, con agitación suave y continua. Luego se realizaron 5 lavados de 15 minutos cada uno

con buffer TBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Para detectar los anticuerpos unidos se agregó en dilución 1/5000, un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo producido en cabra, acoplado a la enzima peroxidasa (Pierce). Finalmente se realizaron nuevamente los lavados para eliminar el exceso de este segundo anticuerpo y se agregó un sustrato para visualizar la banda donde el primer anticuerpo se unió a la proteína específica. La detección se realizó por un método inmunoquímico, que consiste en agregar peróxido de hidrógeno junto con un compuesto incoloro (4 Cl-1 naftol), sustrato de la peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo, que formará un precipitado en la zona donde se encuentra la proteína de interés.

II.7- Preparación de sistemas modelo de membranas (liposomas).

Los liposomas son vesículas lipídicas compuestas principalmente por fosfolípidos organizados en bicapas, donde los grupos polares están en la superficie y las cadenas hidrofóbicas quedan secuestradas en el interior apolar. Las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas que determinan esta formación. Estas vesículas contienen una fase acuosa interna y están suspendidas en una fase acuosa externa, pudiendo tratarse de la misma o distinta solución.

Para su preparación se resuspende la cantidad necesaria de lípidos en cloroformo. Se evapora el solvente bajo una corriente de N₂ y luego se coloca 2 hs en bomba de vacío para evaporar los restos de cloroformo. Luego se agrega la solución acuosa con agitación energética para formar los liposomas. Estas partículas se denominan vesículas multilamelares (MLV), porque están formadas por varias bicapas lipídicas concéntricas. Forzando a estas partículas a pasar a través de una membrana Nuclepore con un poro de tamaño determinado, (0.1 µm de diámetro) utilizando el extrusor Avestin, se forman las vesículas unilamelares grandes (LUV), constituidas por una única bicapa lipídica. Esta técnica se denomina extrusión.

II.8- Métodos de Fluorescencia.

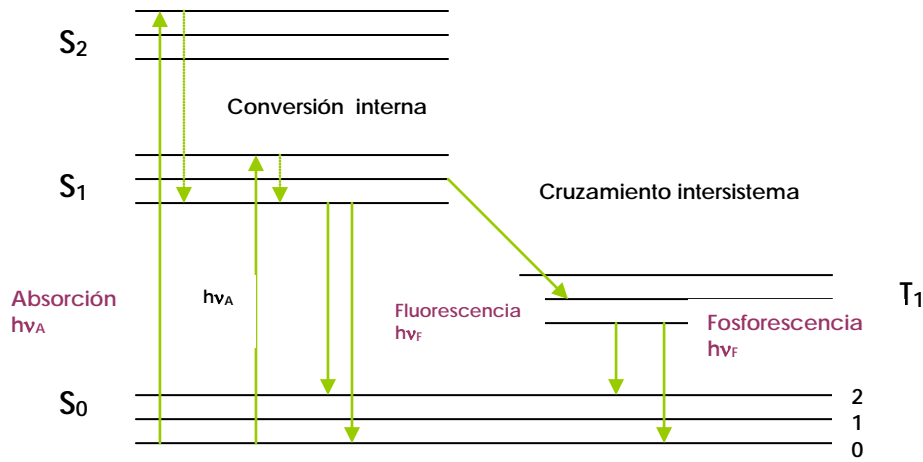
II.8.1- Fundamentos generales (Lackowicz, 1984).

La luminiscencia es la emisión de fotones desde estados electrónicamente excitados. La luminiscencia se divide en dos tipos, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza de los estados basal y excitado. En un estado singlete, el electrón en el orbital de energía superior tiene la orientación del *spin* opuesta a la del segundo electrón en el orbital inferior. Se dice que estos dos electrones están apareados. En un estado triplete estos electrones están desapareados, o sea que sus espines tienen la misma orientación. El regreso al estado basal del electrón excitado desde un estado singlete no requiere que el electrón cambie su orientación de *spin*. La fluorescencia es la emisión que resulta del regreso de un electrón al nivel basal de un electrón apareado. Estas transiciones están cuánticamente "permitidas" y las velocidades de emisión están en el orden de 10^8 seg^{-1} . Estas altas velocidades de emisión resultan en vidas medias de fluorescencia de 10^{-9} seg. El tiempo de vida del estado excitado es el tiempo promedio en el que un fluoróforo permanece en el estado excitado. Las sustancias que desarrollan fluorescencia poseen electrones deslocalizados, formalmente presentes en dobles enlaces conjugados.

Los espectros de fluorescencia generalmente son presentados como espectros de emisión, o sea, la variación de la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda. Estos espectros son dependientes de la estructura química del fluoróforo y del solvente en el que están disueltos.

La absorción y emisión de luz están ilustradas en el diagrama sugerido por A. Jablonski. El estado basale y el primer y segundo estado electrónico son representados por S_0 , S_1 , y S_2 , respectivamente. En cada uno de estos niveles de energía electrónica, los fluoróforos pueden existir en un número de estados vibracionales, señalados como 0, 1, 2, etc.

Esquema de Jablonski.



La absorción ocurre en el orden de 10⁻¹⁵ seg, un tiempo demasiado corto para que se produzca un desplazamiento nuclear significativo. La relación de moléculas en los estados vibracionales 0 y 1 sigue una distribución de Boltzman:

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

donde K=cte de Boltzman, ΔE es la diferencia de energía entre los dos estados y T es la temperatura en grados Kelvin. A temperatura ambiente R= 0.01, lo que significa que, al estar la mayoría de las moléculas en su estado vibracional más bajo, la absorción ocurre desde el nivel inferior. Luego de la absorción de luz pueden ocurrir varios procesos. Un fluoróforo es generalmente excitado a algún nivel vibracional superior de S₁ o S₂. Salvo excepciones, las moléculas rápidamente se relajan a los niveles vibracionales inferiores de S₁. Este proceso se llama conversión interna y generalmente ocurre en 10⁻¹² seg. Dado que los tiempos de vida del estado excitado son típicamente cercanos a 10⁻⁸ seg, la interconversión interna es completa previo a la emisión. Así, la emisión de fluorescencia generalmente ocurre de estados excitados, térmicamente equilibrados. Asimismo, la emisión también ocurre hasta un nivel vibracional excitado del S₀, habiendo interconversión interna posterior.

II.8.1.1- Corrimiento de Stokes.

El diagrama de Jablonski revela que la energía de la emisión es menor que la energía de absorción por lo tanto, excepto para átomos en fase vapor, se observa un corrimiento de la emisión hacia longitudes de onda mayores, o sea con pérdida de energía. Este proceso puede tener varias causas. Una causa común de corrimiento de Stokes, es el rápido descenso a los niveles vibracionales más bajos de S_1 , más aún, los fluoróforos generalmente decaen a niveles vibracionales excitados de S_0 , resultando en pérdidas adicionales de energía vibracional; además de estos efectos, los fluoróforos pueden presentar corrimientos adicionales, debido a efectos del solvente y reacciones del estado excitado. Un ejemplo es el grado de exposición del triptófano al solvente.

II.8.1.2- Quenching de fluorescencia.

Se denomina *quenching* a cualquier proceso que disminuya la intensidad de fluorescencia de una muestra. Una variedad de interacciones moleculares pueden resultar en *quenching*, incluyendo reacciones en el estado excitado, rearreglos moleculares, transferencia de energía, formación de complejos en el estado basal y *quenching* colisional.

El *quenching* colisional ocurre cuando el estado excitado de un fluoróforo es desactivado por contacto con alguna otra molécula en solución (*quencher*), en este caso el *quencher* debe difundir hasta el fluoróforo durante el estado excitado y el fluoróforo vuelve al estado basal sin emisión de fotones. Durante el proceso las moléculas no son alteradas químicamente. Hay una amplia variedad de moléculas que pueden actuar como *quenchers* colisionales, entre ellas oxígeno, halógenos, aminas y acrilamida. El mecanismo de *quenching* varía según el par fluoróforo-*quencher*.

Además del *quenching* colisional los fluoróforos pueden formar complejos no-fluorescentes con el *quencher*, este proceso es un

quenching estático ya que ocurre en el estado basal y no depende de la difusión o colisión molecular. El *quenching* también ocurre por una variedad de mecanismos no moleculares como la atenuación de la luz incidente por el mismo fluoróforo o por otras especies en solución.

En este trabajo de tesis el auto-*quenching* de la fluorescencia del FITC unido covalentemente al LPS fue empleado para evaluar las propiedades de agregación del LPS.

II.8.1.3- Transferencia de energía.

Otro proceso importante que ocurre durante el estado excitado es la transferencia de energía. Este proceso ocurre cuando el espectro de emisión de un fluoróforo, llamado donador (D), se superpone con el espectro de absorción de otra molécula llamada aceptor (A) y así la energía de una molécula excitada de donador es cedida al aceptor. Esta transferencia ocurre sin emisión de fotones y es el resultado de la interacción dipolo-dipolo entre el donador y el aceptor.

El grado de transferencia de energía depende del grado de superposición del espectro de emisión del donador con el espectro de absorción del aceptor, la orientación de los dipolos de transición del donador y del aceptor y de la distancia entre estas dos moléculas. Esta última dependencia es la que determina la utilidad de la transferencia de energía para determinar distancias entre donador y aceptor. Tales mediciones requieren que el par donador-aceptor estén separados una distancia que no varíe durante la vida media del estado excitado del donador.

La tasa de transferencia de energía $k_t(r)$ es dada por:

$$k_t(r) = 1/\tau_D (R_0/r)^6$$

donde τ es el tiempo de vida del donador en ausencia de aceptor, r es la distancia entre donador y aceptor, y R_0 es una distancia característica de

cada par donador-aceptador, llamada distancia de Förster, a la cual la eficiencia de transferencia de energía es del 50%. Esta dependencia con la distancia es útil para distancias críticas entre 20 y 50 Å, que son las distancias comparables al diámetro de la mayoría de las proteínas y el espesor de las membranas biológicas. En este trabajo de tesis se empleó la técnica de transferencia de energía entre fosfolípidos marcados con NBD-PE y Rh-PE incorporados en liposomas, para determinar la intercalación del LPS en membranas y también para estudiar la interacción entre el LPS y la apo A1 siguiendo FRET entre los residuos Trp de la proteína y un fluoróforo externo (ANS).

II.8.1.4- Scattering.

Muchas muestras biológicas presentan una turbidez significativa. Como consecuencia, la luz incidente puede ser dispersada e interferir produciendo falsos aumentos en la fluorescencia detectada. Por lo tanto, es importante trabajar en condiciones de mínimo *scattering* o de lo contrario, cuantificarlo mediante blancos apropiados para corregir las lecturas.

Un uso interesante que se le ha dado al *scattering*, surge del hecho de que la turbidez es dependiente de la concentración y del tamaño de las partículas presentes en la cubeta de medida. Por lo tanto, es útil analizar su valor en reacciones de asociación o interacción, en las cuales ocurra una modificación en el tamaño de las partículas dispersantes como por ejemplo durante el proceso de micelización de liposomas multilamelares por acción de apo A1 y la solubilización de liposomas por detergentes.

II.8.2 Fluorescencia en proteínas.

La fluorescencia intrínseca de una proteína es el resultado de la presencia de fluoróforos naturales en la mayoría de ellas, como los aminoácidos Phe, Tyr y Trp. En general la fluorescencia de la Tyr y Phe es muy débil. El Trp es un muy buen fluoróforo debido a su alta eficiencia

de fluorescencia y a que el grupo indol es altamente sensible a la polaridad del solvente, estando sujeto a cambios generales y específicos. Como resultado de esto, el espectro de emisión de los residuos Trp puede reflejar la polaridad del entorno que lo rodea. Estos espectros son sensibles a la unión con sustratos y a reacciones de asociación y desnaturalización.

La apo AI posee 4 residuos Trp por molécula, localizados en las posiciones 8, 50, 72 y 108, de modo que el análisis de su emisión dio información muy valiosa en distintos ensayos de este trabajo de tesis. Debe recordarse que en todos los casos las mediciones son promedio de los cambios sufridos por todos los grupos, ya que no es fácil calcular la contribución de cada uno de ellos.

II.9- Bibliografía.

- Lackowicz, J. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press New York N.Y. (1984).
- Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970), 680-685.
- Lowry, O, Rosebrough, N, Farr, A, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193 (1951), 265-275.
- Oakley, B, Kirsch, D, Morris, N. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 105 (1980), 361-363.
- Schägger, H, von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem. 166 (1987), 368-379.
- Tricerri, A, Córscico, B, Toledo, J, *et al.* Conformation of Apolipoprotein A-I in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol. Biochem et Biophys Acta 1391 (1998), 67-78.

Capítulo III: Efecto del LPS sobre la funcionalidad de apo AI.

Capítulo III: Efecto del LPS sobre la funcionalidad de apo AI.

III.1- Introducción.

Las HDL plasmáticas son lipoproteínas heterogéneas en tamaño, densidad y composición lipídica y proteica (Skinner, 1994). La apo AI, el principal componente proteico de las HDL, juega un rol importante en el transporte de lípidos y algunos investigadores postulan que esta molécula es responsable de los efectos neutralizantes del LPS por parte de las HDL (Massamiri, 1997), (Flegel, 1993), (Emancipator, 1992).

Si bien el mecanismo por el cual el LPS interactúa con las HDL no está del todo entendido, se proponen roles para los fosfolípidos (Levine, 1993), (Parker, 1995), para la apo AI (Massamiri, 1997) y para la LBP (Park, 1996).

Una de las características funcionales de la apo AI es su capacidad de solubilizar liposomas multilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina (MLV-DMPC) a la temperatura de transición del fosfolípido, proceso denominado micelización. La acción surfactante de la apo AI sobre las MLV-DMPC para producir partículas micelares del tamaño general de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), está bien documentada (Jonas, 1980). Este tipo de interacciones puede ser de gran importancia en la biogénesis de precursores de HDL en células del hígado o intestino (Green, 1978), (Hamilton, 1972), (Tall, 1979). El tipo de interacción entre la apo AI y las bicapas de fosfolípidos, así como la naturaleza y tamaño de los complejos DMPC:apo AI formados dependen de la proporción lípido:apo AI en la mezcla de reacción (Jonas, 1980), la composición química de la bicapa, en particular su contenido de colesterol (Jonas, 1978), (Pownall, 1979), (Tall, 1978), del estado físico de la bicapa (Pownall, 1979), (Jonas, 1977) y de la cinética de la interacción (Pownall, 1978).

Pownall *et al.* (Pownall, 1978); (Pownall, 1979) demostraron que la interacción de la apo AI con liposomas de DMPC, con o sin colesterol, está determinada cinéticamente; la tasa máxima de formación de complejos micelares ocurre a la temperatura de transición del fosfolípido y disminuye marcadamente tanto si la temperatura está por encima o por debajo de la misma. Dicha interacción entre la apo AI y las bicapas fosfolípídicas involucra dos procesos principales: la unión de la apo AI a la bicapa y la ruptura de la misma en complejos más pequeños.

La unión de la apo AI a las vesículas de DMPC ocurre en pocos minutos y los complejos apo AI-DMPC formados son estables. La ruptura de las vesículas para dar lugar a los complejos micelares es el paso limitante de la velocidad del proceso (Jonas, 1980).

Estudios previos (Pownall, 1978), (Swaney, 1980), (Jonas, 1981) han demostrado que el estado físico de la bicapa lipídica es un factor limitante que controla la asociación de la apo AI con bicapas de fosfatidilcolina (PC) (fosfolípido zwitteriónico). La tasa de asociación de la apo AI con MLV de PC sintética es rápida sólo en un rango estrecho de temperaturas, próximo a la temperatura de transición de fases gel-líquido cristalino. Ha sido descrito que la presencia de defectos en las membranas que se encuentran en la zona de coexistencia de fase gel y líquido-cristalina a la temperatura de transición, es una condición necesaria para la inserción efectiva de la apo AI dentro de bicapas y para la subsecuente formación de partículas lipoproteicas. En bicapas formadas por DMPC y diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) la apo AI remueve lípidos preferentemente de la fase líquido-cristalina. Igualmente para interactuar con éstos dominios probablemente es requerido un gran área de defectos producidos por la coexistencia de dominios (Tricerri, 2005).

El mecanismo de interacción de la apo AI con fosfolípidos ácidos es marcadamente diferente. En contraste con PC, la asociación de apo

AI con los fosfolípidos ácidos ocurre no sólo cerca de la temperatura de transición sino también en el estado líquido-cristalino (Surewicz, 1986).

La incorporación de colesterol en los complejos micelares de apo AI-PC también ha sido descrita. Por encima del 20-30% en moles de contenido de colesterol, la reacción disminuye marcadamente, aún con DMPC (Jonas, 1978), (Jonas, 1978), (Pownall, 1979).

El objetivo de este capítulo de tesis es estudiar la interacción del LPS con la apo AI, utilizando el proceso de micelización como parámetro de la funcionalidad de la proteína.

III.2-Materiales y Métodos.

III.2.1- Materiales.

Dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) (Avanti Polar Lipids), Merocianina 540 (MC 540) (Molecular Probes), LPS *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Chemical, Co), Cloruro de Guanidina (Sigma Chemical, Co).

III.2.2- Solubilización de liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC) por acción de la apo AI.

Se prepararon vesículas multilamelares de DMPC en buffer A, tal cual se describió en el capítulo II (Materiales y Métodos Generales).

Se agregó apo AI o apo AI-LPS en una relación 100:1 lípido:proteína (mol:mol) a una suspensión de MLV-DMPC (0.5 mg/ml) a 24°C. La mezcla apo AI-LPS fue pre-incubada por 15 minutos a 25°C, en relación 28:1 y 2.8:1 proteína:LPS (mol:mol).

La micelización de MLV-DMPC por acción de apo AI o apo AI-LPS se analizó por disminución de la turbidez de la solución de liposomas, siguiendo los valores de absorbancia a 350 nm (A_{350}) a 24°C cada 5 minutos, empleando un espectrofotómetro SLM Aminco DW 2000.

Los productos obtenidos del proceso de micelización fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente en condiciones nativas (PAGGE) 4-25% y se visualizaron por tinción de plata para proteínas, tal cual se describió en el capítulo II (Materiales y Métodos Generales).

III.2.3- Solubilización de liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC) por acción del LPS.

Se prepararon vesículas multilamelares de DMPC en buffer A, tal cual se describió en el capítulo II (Materiales y Métodos Generales).

Se agregó LPS en una relación 35:1 lípido:LPS (mol:mol) a una suspensión de MLV-DMPC (0.5 mg/ml) a 24°C. La relación lípido:LPS utilizada respeta las relaciones ensayadas en presencia de apo AI.

La micelización de las MLV-DMPC por acción de LPS se analizó por disminución de la turbidez de la solución de liposomas, siguiendo los valores de absorbancia a 350 nm (A_{350}) cada 5 minutos en un espectrofotómetro SLM Aminco DW 2000.

III.2.4- Medida de espectros de emisión de los Trp de la apo AI.

Para analizar el efecto del LPS sobre la estructura de la apo AI, se midió el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína (320-360 nm) en ausencia y en presencia de LPS (relación 2.8:1 y 28:1 apo AI:LPS mol:mol). La concentración de proteína utilizada fue de 0.08 mg/ml. Previo a las medidas se realizó una incubación de apo AI-LPS por 15 minutos a 25°C en buffer A. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 50B excitando a 295 nm utilizando rendijas de 8 nm y 4 nm para excitación y emisión, respectivamente.

III.2.5- Espectros de absorción de Merocianina 540 (MC 540).

La Merocianina 540 (MC540) (Figura III.1) es una sonda lipofílica que ha sido ampliamente utilizada para investigar las propiedades de membrana, como el empaquetamiento de los fosfolípidos y la transición de fases. La sonda puede incorporarse fácilmente en las bicapas de fosfolípidos y particiona en la fase lipídica cuando se agrega externamente a una suspensión acuosa de liposomas (Kaschny, 1992).

La MC540, cuando se encuentra disuelta en agua, posee dos picos de absorción, uno a 500 nm (dímero) y otro a 530 nm (monómero) y presenta un único pico a 570 nm (monómero) cuando se encuentra disuelta en un solvente no polar. En presencia de liposomas en estado gel, donde las cadenas acilo de los fosfolípidos se encuentran ordenadas y bien empaquetadas, el espectro de la MC540 es comparable a aquel correspondiente a la sonda disuelta en agua ya

que no puede penetrar en la membrana. Cuando los liposomas se encuentran en estado fluido o líquido cristalino el espectro muestra un pequeño hombro a 530 nm y un pico bien definido a 570 nm (Lelkes, 1980) ya que el menor empaquetamiento de los fosfolípidos en fase líquido-cristalina permite el ingreso de la sonda a la bicapa. Por estas características, la intensidad de absorción a 570 nm (A_{570}) puede ser utilizada para detectar la transición de fase de las bicapas.

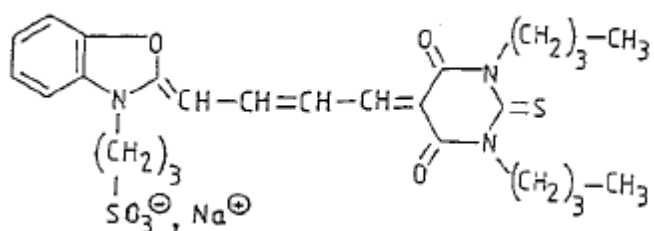


Figura III.1: Estructura de la merocianina 540.

Para determinar si la presencia de LPS modifica la temperatura de transición de fase de las membranas de DMPC, se midió el espectro de absorción de MC 540 en presencia de una suspensión de MLV-DMPC (0.5 mg/ml) y MLV-DMPC-LPS (35:1 lípidos:LPS mol:mol) en el rango de temperaturas de 16-28°C utilizando un espectrofotómetro SLM Aminco DW 2000.

III.3- Resultados y Discusión.

III.3.1- Solubilización de liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC): Ensayo de micelización.

Una de las propiedades de la apo AI es su capacidad de solubilizar liposomas de DMPC a la temperatura de transición de fase del fosfolípido, formando complejos micelares discoidales del tamaño característico de las HDL (Jonas, 1980). Utilizando esta propiedad de la apo AI se estudió el efecto del LPS sobre la cinética y la eficiencia del proceso de micelización de MLV-DMPC por acción de dicha proteína.

Al agregar apo AI a una suspensión de liposomas de DMPC (0.5 mg/ml) en una relación 100:1 lípido:proteína (mol:mol), se determinó un 90% de eficiencia en el proceso de micelización, al analizar la disminución en la turbidez de la suspensión de liposomas por medidas de absorbancia a 350 nm a lo largo de 90 minutos. Cuando a la suspensión de liposomas se le agrega la apo AI pre-incubada con LPS el proceso de micelización procede a una tasa inicial similar, pero a lo largo de los 90 minutos la disminución en la turbidez observada fue del 62% y del 37% en presencia de LPS en relaciones 28:1 y 2.8:1 proteína:LPS (mol:mol), respectivamente (Figura III.2). En estos casos el equilibrio no fue alcanzado en el período de tiempo estudiado.

Con el fin de analizar la cinética de micelización, las curvas de disminución de la turbidez (Figura III.2) se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$\text{Abs}_{350} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad (\text{Ec. III.1})$$

En ausencia de LPS la disminución en la turbidez producida por la apo AI puede ser descripta por un decaimiento exponencial simple ajustando la curva a la ecuación:

$$\text{Abs}_{350} = A e^{-k t} + B \quad (\text{Ec. III.2})$$

con $A=0.279 \pm 0.006$ unidades de absorbancia, $k = 0.084 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$, y $B= 0.034$ unidades de absorbancia.

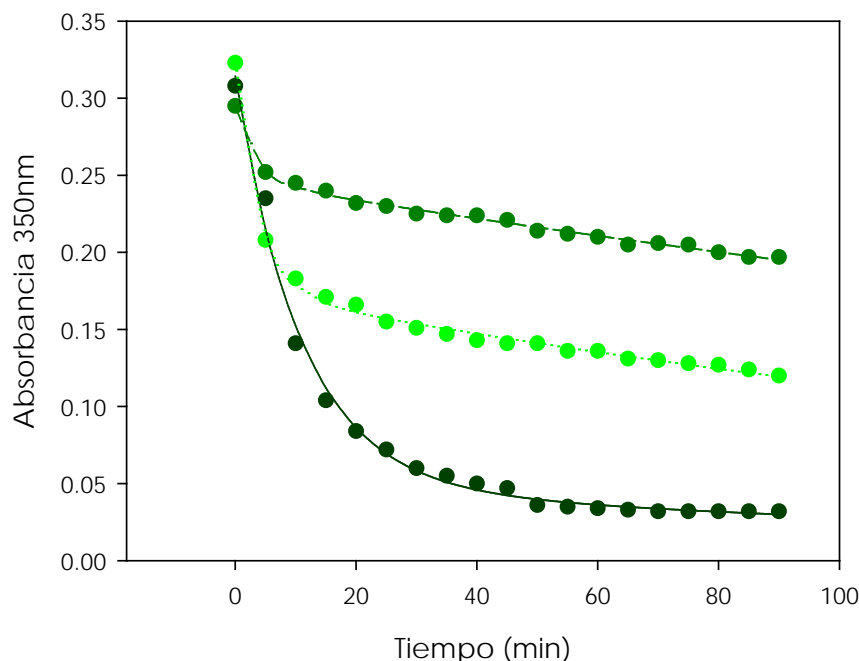


Figura III.2: Cinética de micelización de MLV-DMPC por apo AI (●), apo A-I:LPS 28:1(mol:mol) (●) y apo A-I:LPS 2.8:1 (mol:mol) (●). MLV-DMPC 0.5 mg/ml en buffer A, relación MLV-DMPC:apo AI 100:1 (mol:mol). La disminución de la turbidez se siguió por medidas de absorbancia a 350 nm a 24°C cada 5 minutos. Las curvas, normalizadas a 0.33 unidades de Absorbancia a 350 nm, se ajustaron a la ecuación III.1. Los parámetros de ajuste se describen en la tabla III.1.

En presencia de LPS el proceso de micelización es bifásico y se ajusta a un decaimiento exponencial doble. Los parámetros de ajuste de las curvas de micelización se describen en la tabla III.1. Según estos parámetros, la menor eficiencia en la cinética de micelización observada en presencia de LPS se debe principalmente a una disminución en la amplitud de la fase rápida, aunque es aparente cierta influencia sobre las constantes de velocidad.

Tabla III.1: Parámetros que describen la cinética de micelización de liposomas de DMPC por apo AI, en presencia y ausencia de LPS.

Apo AI:LPS (mol:mol)	A1 (unidades de Abs)	A2 (unidades de Abs)	k1 (min ⁻¹)	k2 (min ⁻¹)
28:0	0.266 ± 0.014	0.048 ± 0.014	0.092 ± 0.008	0.0053 ± 0.0042
2.8:1	0.148 ± 0.004	0.174 ± 0.002	0.255 ± 0.017	0.0042 ± 0.0003
28:1	0.049 ± 0.003	0.246 ± 0.001	0.301 ± 0.044	0.0026 ± 0.0001

Se utilizó la ecuación *III.1* para el ajuste de las curvas de micelización con el fin de determinar las constantes de velocidad (k) y las amplitudes (A) correspondientes.

Como se expuso anteriormente la interacción de la apo AI con MLV-DMPC depende de la proporción lípido-apo AI y del estado físico y composición química de las bicapas, en particular de su contenido de colesterol (Jonas, 1980), (Jonas, 1978), (Pownall, 1979), (Tall, 1978). A partir de los resultados obtenidos por medio de los ensayos de solubilización de liposomas, podemos concluir que la presencia de LPS es otro factor que modifica la cinética del proceso de micelización de MLV-DMPC por acción de la apo AI. Dicho proceso se ve severamente afectado al pre-incubar la proteína con LPS, provocando menor eficiencia de micelización y una cinética bifásica donde el componente rápido disminuye en amplitud al aumentar la concentración de LPS.

El LPS posee la capacidad de micelizar liposomas de DMPC, en la misma relación LPS:lípido empleada en los ensayos anteriores. La eficiencia del proceso de micelización es del 25%, respecto al valor de eficiencia de micelización de apo AI sola (Figura III.3).

Estos resultados indicarían que el LPS tiene la capacidad de extraer lípidos de los liposomas de DMPC, disminuyendo así la relación lípido:apo AI en los ensayos de micelización por acción de la proteína, pudiendo explicar parcialmente la disminución del proceso de micelización que como se expuso anteriormente depende de la relación lípido:proteína.

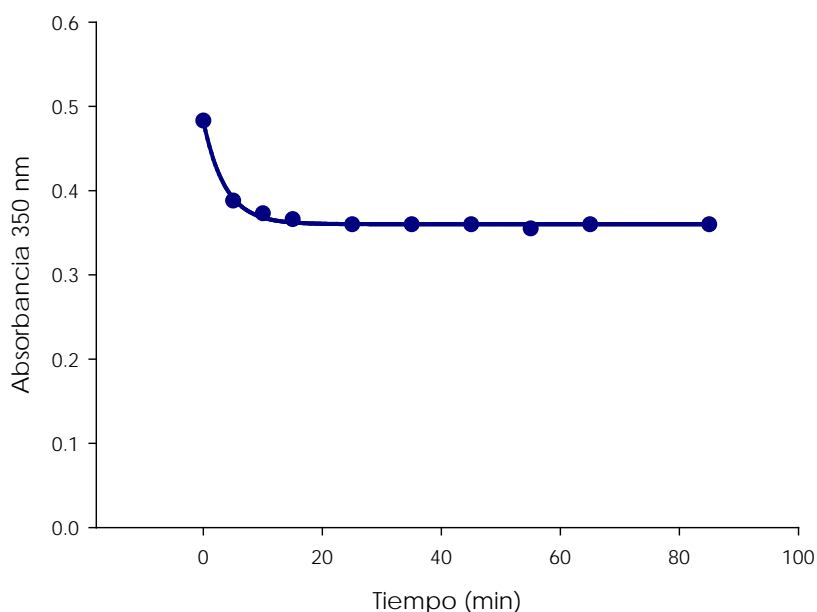


Figura III. 3: Cinética de micelización de MLV-DMPC por acción del LPS. MLV-DMPC 0.5 mg/ml en buffer A, relación MLV-DMPC:LPS 35:1 (mol:mol). La disminución de la turbidez se siguió por medidas de absorbancia a 350 nm a 24°C cada 5 minutos.

Sin embargo a la relación LPS:lípido empleada en los experimentos de micelización por acción de la apo AI, la absorbancia no decae a cero, siendo la extracción de lípidos limitada.

III.3.2- Caracterización de los productos de micelización.

Con el fin de caracterizar las partículas formadas en las diferentes condiciones ensayadas (apo AI y apo AI-LPS), los productos de micelización obtenidos fueron analizados por electroforesis utilizando

geles en gradiente bajo condiciones no desnaturizantes (PAGGE 4-25%), como fue descrito en el capítulo II. Como puede observarse en la Figura III.4, en ausencia de LPS se forman 2 productos principales con pesos moleculares de 189 kDa y 340 kDa, estos complejos corresponden a lipoproteínas discoidales que contienen 2 y 3 moléculas de apo AI por partícula, respectivamente, como fue previamente determinado (Tricerri, 1998), (Tricerri, 2002). En presencia de bajas concentraciones de LPS (28:1 proteína:LPS, mol:mol) se forman ambos productos aunque en menor proporción. Sin embargo, al preincubar la apo AI con altas concentraciones de LPS (2,8:1 proteína:LPS, mol:mol) sólo se observan los complejos que poseen 2 moléculas de apo AI/partícula como producto del proceso, indicando que la presencia de LPS no permite la formación de los complejos micelares de mayor peso molecular.

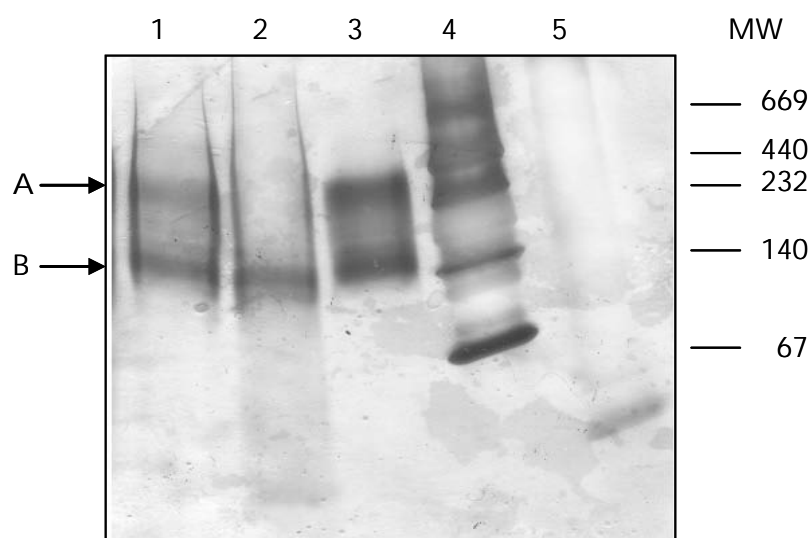


Figura III.4: Análisis de los productos de micelización por PAGGE (4-20%). En el gel se sembraron 5 μ g de proteínas y se realizó una tinción de plata para proteínas. Las flechas A y B señalan las partículas formadas por 3 y 2 moléculas de apo AI, respectivamente.

Calles: 1-MLV-DMPC:apoAI:LPS (28:1 proteína:LPS, mol:mol), 2- MLV-DMPC:apo AI:LPS (2,8:1 proteína:LPS, mol:mol), 3-MLV-DMPC:apo AI (100:1 mol:mol), 4-marcadores de alto peso molecular (Amersham), 5- estándar de apo AI.

El número reducido de moléculas de apo AI observado en las partículas formadas luego del proceso de micelización de liposomas en presencia de altas concentraciones de LPS (relación molar 2,8:1 proteína:LPS), puede atribuirse a un efecto directo sobre la conformación de la apo AI. Como consecuencia de la interacción de la proteína con el LPS, cargado negativamente, se produce una repulsión entre moléculas de apo AI, que están muy cercanas entre ellas según el modelo propuesto de la conformación adoptada por la apo AI en rHDL (modelo del cinturón) (Tricerri, 2001). Por otro lado, como ya se mencionó, el número de moléculas de apo AI por partícula en los complejos micelares depende, entre otros, de la relación lípido:proteína; por esta razón no es posible descartar que ocurra un intercambio entre el LPS y los fosfolípidos que promueva una disminución en la relación lípido:proteína generando los productos de micelización observados en presencia de LPS.

III.3.3 Efecto del LPS en la fluorescencia intrínseca de la apo AI.

Debido a la estrecha relación estructura-función en las proteínas, un cambio conformacional en la apo AI generado por interacción con el LPS, podría dar lugar a la disminución en la eficiencia del proceso de micelización.

Con el fin de determinar si la presencia de LPS modifica la conformación de la proteína, y de aquí la disminución de la eficiencia del proceso de micelización observada, se estudiaron las propiedades de fluorescencia intrínseca de la apo AI.

La fluorescencia de los residuos Trp es sensible a la polaridad del entorno, y dado que la apo AI posee 4 residuos Trp localizados en la porción amino terminal (Nt) de la proteína (residuos 8, 50, 72 y 108) (Segrest, 1992) en este trabajo se emplearon las medidas de fluorescencia intrínseca para determinar cambios en la conformación de la apo AI inducidos por la interacción con el LPS.

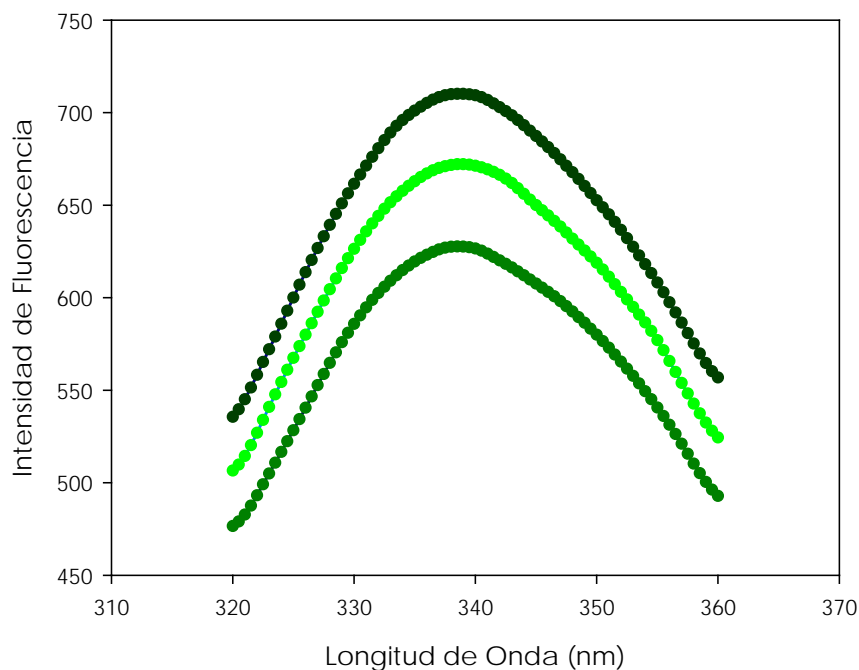


Figura III.5: Efecto del LPS sobre la fluorescencia intrínseca de la apo AI. Espectros de fluorescencia de apo AI (●), apo AI:LPS 28:1 (●) y 2.8:1 (●) mol:mol. Apo AI 0.08 mg/ml.

Como puede observarse en la Figura III.5, el espectro de emisión de fluorescencia de los Trp de apo AI en buffer A posee un máximo a 338.5 nm. Al pre-incubar la proteína con diferentes concentraciones de LPS, el espectro de emisión muestra un corrimiento de aproximadamente 1 nm (máximo de emisión a 339.5 nm) y la intensidad de fluorescencia intrínseca disminuye. Estos parámetros espectrales reflejan, en promedio, la polaridad del entorno local de los residuos Trp. En presencia de LPS, el entorno de los Trp es en promedio más polar respecto a la proteína en buffer, indicado por un leve corrimiento del máximo de emisión del espectro hacia el rojo (mayores longitudes de onda). La importante disminución en la intensidad de fluorescencia luego de la incubación de la apo AI con LPS, puede ser explicada si

ocurre algún cambio conformacional en la proteína que genere un *quenching* de la fluorescencia de los residuos Trp por residuos vecinos en la proteína.

Estos resultados indicarían que la presencia de LPS modifica la conformación de la proteína y este cambio puede también ser el causante de la disminución de la eficiencia del proceso de micelización.

III.3.4- Determinación de la temperatura de transición de fase de DMPC. Efecto del LPS.

Como ya se mencionó, el proceso de micelización ocurre a la temperatura de transición de fase del lípido (T_t), debido a la presencia de defectos en el empaquetamiento generados por la co-existencia de fases gel y líquido cristalina, que promueven las interacciones lípido-proteína (Papahadjopoulos, 1973). Con el fin de determinar si la disminución en la eficiencia del proceso de micelización por apo AI en presencia de LPS es debida a un efecto de la endotoxina sobre la bicapa lipídica, se decidió estudiar si se producen cambios en la T_t del DMPC por efecto de dicha interacción.

El parámetro T_t fue determinado empleando MC 540, sonda lipofílica que se une a las membranas y puede emplearse para estudiar el empaquetamiento de los fosfolípidos y la transición de fase de los mismos. La partición lípido-agua de la sonda es sensible al estado físico de las membranas, por tal motivo, el cambio abrupto en la intensidad de absorción de la sonda a 570 nm (A_{570}) fue utilizado para detectar la transición de fase.

Como puede observarse en la Figura III.6, la presencia del LPS, a la concentración utilizada, no modifica la temperatura de transición de los MLV-DMPC, determinada en 23.5°C, para ambas condiciones ensayadas (ausencia y presencia de LPS).

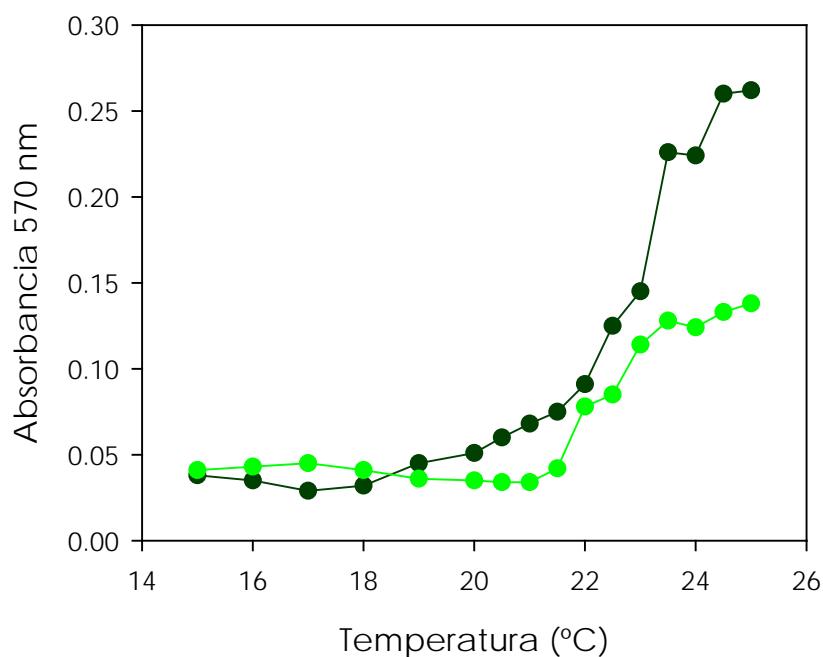


Figura III.6: Temperatura de transición de fase de MLV-DMPC con (●) y sin (●) LPS. MLV-DMPC 0.5 mg/ml en buffer A, relación MLV-DMPC:LPS 35:1 (mol:mol). La temperatura de transición se monitoreo midiendo la absorbancia a 570 nm de la sonda MC 540 en función de la temperatura.

Sin embargo, debido a que la MC 540 posee cargas negativas, la presencia de cargas negativas en la superficie de la membrana como resultado de la incorporación de LPS, puede jugar un rol importante en el proceso de incorporación de la sonda en la misma (Mateasik, 2002). La repulsión electrostática entre cargas negativas presentes en la MC 540 y en los liposomas daría lugar a una menor partición de la sonda en la bicapa. En la Figura III.6 puede observarse que, a temperaturas mayores a la temperatura de transición, la absorbancia de la sonda en liposomas en presencia de LPS es menor respecto a la absorbancia de MC540 en liposomas en buffer A.

En base a estos resultados puede deducirse que la disminución de la eficiencia del proceso de micelización en presencia de LPS no se

debe a una modificación en la Tt de DMPC, pero no es posible descartar que la interacción del LPS con las membranas provoque cambios en otras propiedades de la bicapa lipídica importantes en la interacción.

Los resultados de este capítulo de tesis sugieren que el LPS es capaz de interactuar tanto con lípidos (membranas) como con la proteína, modificando propiedades de ambas moléculas. A partir de esta primer aproximación se abren dos líneas de estudio, la interacción del LPS con membranas y su efecto en las propiedades de las mismas y la interacción de la endotoxina con la apo AI, con el fin de determinar la región de la proteína involucrada en la interacción.

III.4- Bibliografía.

- Emancipator, K, Csako, G, Elin, R. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoprotein and apolipoprotein. *Infection and Immunity*. 60 (1992), 596-601.
- Flegel, W, Baumstark, M, Weinstock, C, *et al*. Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low and high density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infection and Immunity*. 61 (1993), 5140-5146.
- Green, P, Tall, A, Glickman, R. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 61 (1978), 528-534.
- Hamilton, R. Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 26 (1972), 7-24.
- Jonas, A, Drengler, S. Kinetics and mechanism of apolipoprotein A-I interaction with L-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 2190-2194.
- Jonas, A, Drengler, S, Kaplan, J. Interaction of apolipoprotein A-I with dimyristoylphosphatidylcholine particles of various sizes. *J. Biol. Chem.* 256 (1981), 2420-2426.
- Jonas, A, Drengler, S, Patterson, B. Two types of complexes formed by the interaction of apolipoprotein A-I with vesicles of L-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 255. (1980), 2183-2189.
- Jonas, A, Hesterberg, L, Drengler, S. Incorporation of excess cholesterol by high density serum lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 528 (1978), 47-57.
- Jonas, A, Krajnovich, D. Effect of cholesterol on the formation of micellar complexes between bovine A-I apolipoprotein and L-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 253 (1978), 5758-5763.
- Jonas, A, Krajnovich, D, Patterson, B. Physical properties of isolated complexes of human and bovine A-I apolipoproteins with L-alpha-dimyristoyl phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 252 (1977), 2200-2205.

- Kaschny, P, Goñi, F. The components of merocyanine-540 absorption spectra in aqueous, micellar and bilayer environments. *Eur. J. Biochem.* 207 (1992), 1085-1091.
- Lelkes, P, Miller, I. Perturbations of membrane structure by optical probes: I. Location and structural sensitivity of merocyanine 540 bound to phospholipid membranes. *J. Membr. Biol.* 52 (1980), 1-15.
- Levine, D, Parker, T, Donnelly, T, *et al.* In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 (1993), 12040 -12044.
- Massamiri, T, Tobias, P, Curtiss, L. Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein A-I. *J. Lipid. Res.* 38 (1997), 516-525.
- Mateasik, A, Sikurová, L, Chorvát, DJ. Interaction of merocyanine 540 with charged membranes. *Bioelectrochemistry* 55 (2002), 173-175.
- Papahadjopoulos, D, Jacobson, K, Nir, S, *et al.* Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 311 (1973), 330-348.
- Park, C, Wright, S. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 18054-18060.
- Parker, T, Levine, D, Chang, J, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolisaccharides in human whole blood. *Infection and Immunity.* 63 (1995), 253-258.
- Pownall, H, Massey, J, Kusserow, S, *et al.* Kinetics of lipid-protein interactions: effect of cholesterol on the association of human plasma high-density apolipoprotein A-I with L-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 18 (1979), 574-579.
- Pownall, H, Massey, J, Kusserow, S, *et al.* Kinetics of lipid-protein interactions: interaction of apolipoprotein A-I from human plasma high

density lipoproteins with phosphatidylcholines. *Biochemistry* 17 (1978), 1183-1188.

-Segrest, J, Jones, M, De Loof, H, *et al.* The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 33 (1992), 141-166.

-Skinner, E. High-density lipoprotein subclasses. *Curr. Opin. Lipidol.* 5 (1994), 241-247.

-Surewicz, W, Epanand, R, Pownall, H, *et al.* Human apolipoprotein A-I forms thermally stable complexes with anionic but not with zwitterionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 16191-16197.

-Swaney, J. Properties of lipid apolipoprotein association products. Complexes of dimyristoyl phosphatidylcholine and human apo A-1. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 877-881.

-Tall, A, Green, P, Glickman, R, *et al.* Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. *J. Clin. Invest.* 64 (1979), 233-242.

-Tall, A, Lange, Y. Interaction of cholesterol, phospholipid and apoprotein in high density lipoprotein recombinants. *Biochim. Biophys. Acta* 513 (1978), 185-197.

-Tricerri, A, Córscico, B, Toledo, J, *et al.* Conformation of Apolipoprotein A-I in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol. *Biochem et Biophys Acta* 1391 (1998), 67-78.

-Tricerri, M, Behling Agree, A, Sanchez, S, *et al.* Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments. *Biochemistry* 40 (2001), 5065-5074.

-Tricerri, M, Sanchez, S, Arnulphi, C, *et al.* Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles. *J. Lipid Res.* 43 (2002), 187-197.

-Tricerri, M, Toledo, J, Sanchez, S, *et al.* Visualization and analysis of apolipoprotein A-I interaction with binary phospholipid bilayers. *J. Lipid Res.* 46 (2005), 669-678.

Capítulo IV: Interacción del LPS con membranas.

Capítulo IV: Interacción del LPS con membranas.

IV.1- Introducción.

Como ya se ha adelantado en la Introducción General, si bien está aceptado que el efecto de LPS es inducir la activación de neutrófilos, macrófagos y monocitos a través de su unión al receptor CD14, es posible que a concentraciones de endotoxina suficientemente elevadas, como las que se producen durante la sepsis, el LPS como molécula anfifílica, interaccione directamente con la bicapa lipídica de la membrana plasmática y que interacciones hidrofóbicas lípido-lípido no específicas del LPS con la membrana sean responsables de disparar la activación celular. Las variaciones en la composición lipídica entre los diferentes tipos celulares podrían explicar las diferencias en la respuesta al LPS de cada uno de ellos.

Existen estudios que muestran que eritrocitos de pacientes sépticos unen LPS, encontrando una concentración de LPS en la membrana del eritrocito en el rango de 47 a 103 $\mu\text{g/ml}$ (Poschl, 2003). Warren y colaboradores encontraron que el LPS induce un influjo de Na^+ en el eritrocito, pudiendo ser este un mecanismo por el cual se produzca un incremento en la permeabilidad de la membrana, desencadenando así la activación celular (Warren, 1982).

Otros autores mostraron que la interacción de LPS con eritrocitos produce un incremento en la fluidez de la región más profunda de la matriz lipídica y un incremento en la movilidad de proteínas de la membrana del eritrocito, en particular de la red actina-espectrina que forma parte del citoesqueleto, llevando a una deformación y pérdida en la integridad del eritrocito (Gwozdziński, 2003).

En cuanto a la interacción del LPS con lipoproteínas, si bien diversos autores propusieron que el efecto neutralizante de las HDL se

debe principalmente a la interacción entre el LPS y la apo AI constituyente de dichas lipoproteínas (Imai, 2003), (Ma, 2004), otros autores sostienen que la neutralización del LPS está relacionada con el componente fosfolipídico de las partículas lipoproteicas (Parker, 1995), (Wurfel, 1997).

En el capítulo III se estudió el efecto de la interacción apo AI-LPS en el proceso de micelización. Como surge de los resultados presentados, es posible que el LPS además de interactuar con la apo AI interactúe también con la membrana produciendo alteraciones en las propiedades de la bicapa lipídica y como consecuencia de ello, modificando la eficiencia del proceso de micelización.

Además es necesario tener presente que durante un proceso inflamatorio, el lipopolisacárido (LPS) es liberado de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por la división y/o muerte de las bacterias, en forma de moléculas simples, fragmentos de pared celular o como vesículas de membrana externa (VME). El LPS liberado es captado por los macrófagos, que actúan como barrera de defensa temprana contra los patógenos bacterianos por fagocitosis y degradación de microorganismos. Luego de la internalización, el LPS se localiza en fagosomas, endosomas, complejo de Golgi, mitocondria, núcleo, citoplasma y superficie celular (Kriegsmann, 1993), (Thieblemont, 1999), (Gorvel, 2002). Existen estudios que demuestran que el LPS de *Brucella abortus*, capturado por macrófagos, es reciclado a la membrana plasmática donde se encuentra asociado a macrodominios (Forestier, 1999). Los macrodominios de LPS fueron caracterizados por técnicas bioquímicas y de microscopía, y fue demostrado que actúan como dominios de membrana resistentes a detergentes (DRM's), segregando componentes de los *lipid rafts*, proteínas de unión al LPS y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II). Por medio de medidas de anisotropía de fluorescencia Forestier *et al* (Forestier, 2000) sugirió que el LPS de *Brucella abortus* es responsable de

la formación de complejos rígidos en la superficie de la membrana y de la reorganización de la membrana celular.

La segregación en dominios de varios componentes de los *lipid-raft* y la formación de complejos rígidos en la superficie de la membrana sugiere un rol para el LPS, en la pared bacteriana, similar al del colesterol en la membrana plasmática de las células eucarióticas.

Todos estos efectos estarían mediados directamente por la intercalación de LPS en la matriz hidrofóbica de la membrana.

Por lo expuesto, en este capítulo se enfocó al estudio de la interacción del LPS con membranas desde dos perspectivas diferentes. Primero se estudió la capacidad del LPS presente en medio acuoso de intercalarse en las membranas con el objeto de discutir la importancia de la interacción LPS-membrana en la neutralización del efecto endotóxico. Para esto se emplearon técnicas biofísicas para detectar la intercalación de moléculas de endotoxina en membranas de liposomas, y evaluar si el LPS induce cambios en la interfase hidrofílica/hidrofóbica de la bicapa.

En una segunda parte de este capítulo se caracterizó la formación de dominios inducidos por LPS en membranas, determinando sus propiedades de fase, a través de técnicas de microscopía de fluorescencia de dos-fotones empleando Laurdan como sonda.

Finalmente, se analizó si estos dominios otorgan resistencia a la solubilización frente a detergentes, comportamiento comparable con el conferido por el colesterol.

IV.2-Materiales y métodos.

Parte A: Estudios de la interacción de LPS en solución con sistemas modelo de membrana.

IV.2A.1- Materiales.

Colesterol, LPS y LPS-FITC de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Chemical Co); Dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), Fosfatidilserina (PS), N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-fosfatidilcolina (NBD-PE) y N-(lisamina rodamina B sulfonil) fosfatidiletanolamina (Rh-PE) (Avanti, Polar Lipids); 6-dodecanoil-2-dimetilamino naftaleno (Laurdan) (Molecular Probes).

IV.2A.2- Medidas de Potencial Zeta (ζ) en liposomas.

Las medidas de potencial Zeta fueron realizadas utilizando la técnica denominada microelectroforesis, donde un microscopio es usado para observar las partículas coloidales que se encuentran dentro de una celda electroforética. Dos electrodos colocados en los extremos de la cámara son conectados a una fuente de poder, creándose un campo eléctrico que cruza la celda. Las partículas cargadas migran en el campo y su movimiento y dirección están relacionados con su Potencial Zeta (ζ).

Para los ensayos de Potencial Zeta se utilizaron liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC) preparados tal cual fue descrito en el capítulo II (Materiales y Métodos generales). Los liposomas fueron preparados en buffer A. Se midió el Potencial Zeta (ζ) de los liposomas (1 μ mol) en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de LPS (350:1 y 35:1 lípido:LPS, mol:mol), en un equipo Zeta-Meter System 3.0, a 25°C. En los ensayos en presencia de LPS, los MLV-DMPC fueron incubados con LPS en las diferentes relaciones utilizadas, a 25°C por 30 minutos.

IV.2A.3- Ensayos de transferencia de energía por resonancia (FRET).

Para los experimentos de FRET, los liposomas unilamelares (LUVs) utilizados (DMPC, DMPC:PS 10% y DMPC:Col 20%) fueron preparados tal cual fue descrito en el capítulo II, (Materiales y Métodos generales). Las relaciones lípido:LPS utilizadas en los experimentos son comparables con las utilizadas en los ensayos con MLVs, estimando que en los MLVs el 10% de los lípidos totales está expuesto al solvente.

Los liposomas fueron doblemente marcados con las sondas fluorescentes NBD-PE y Rh-PE. Las sondas fueron disueltas en cloroformo y luego se mezclaron con los lípidos en fase cloroformo, en una relación molar 100:0.6:0.6 PL:NBD-PE:Rh-PE. La longitud de onda de emisión de una de las sondas, el donador (NBD-PE), está en el rango de la longitud de onda de excitación de la otra sonda, el aceptor (Rh-PE). La transferencia de energía entre las dos sondas es sensible a la separación espacial, por lo tanto la intercalación de moléculas no marcadas en los liposomas doblemente marcados da lugar a separación entre las sondas con disminución de la eficiencia de FRET y consecuentemente, la intensidad de emisión del donador aumenta y la del aceptor disminuye (Struck, 1981).

El LPS fue agregado a una solución 100 μ M de LUVs doblemente marcados en una relación molar 35:1 y 3.5:1 lípidos:LPS. Las muestras fueron excitadas a 465 nm (longitud de onda de excitación del NBD-PE) y se registró el espectro de emisión entre 480-600 nm en un espectrofluorómetro SLM 4800. Para el análisis cuantitativo de los experimentos, se determinó la eficiencia de FRET, usando el cociente de las intensidades del aceptor y del donador :

$$\text{Eficiencia de FRET (\%)} = \left\{ \frac{(IA/ID_{LUVs}) - (IA/ID_{+LPS})}{(IA/ID_{LUVs})} \right\} \times 100. \quad (\text{Ec. IVA.1})$$

donde (IA/ID_{LUVs}) corresponde a 100% FRET en ausencia de LPS, (IA/ID_{+LPS}) corresponde a la relación de intensidades donador/aceptor en presencia de LPS.

IV.2A.4- Ensayos de fluorescencia de FITC.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Figura IVA.1) es un agente fluorescente ampliamente utilizado para el marcado por unión covalente de diferentes moléculas debido a que es reactivo con nucleófilos tales como los grupos amino o sulfhidrilo. El FITC se conjuga con los grupos amino presentes en la estructura del LPS. Esta sonda posee muy buen rendimiento cuántico y buena solubilidad en agua, por ende es una sonda utilizada en un amplio rango de aplicaciones.

Para los experimentos de desagregación de LPS realizados en este capítulo de tesis, se midió el espectro de emisión de fluorescencia del LPS-FITC de *E. coli* 0111:B4, en presencia y ausencia de LUVs-DMPC (50 μ M) o DOC 0.2% en buffer A, a 37°C. Las muestras fueron excitadas a 460 nm y se recolectó el espectro de emisión entre 500-650 nm en un espectrofotómetro SLM 4800.

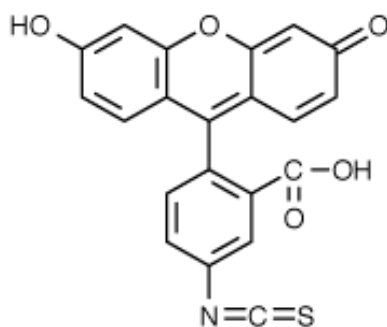


Figura IVA.1: Estructura del FITC.

IV.2A.5- Medidas de polarización generalizada (GP) del Laurdan.

El efecto del LPS sobre la interfase hidrofílica-hidrofóbica de la membrana se determinó por medidas de polarización generalizada (GP) de la sonda Laurdan.

El Laurdan (Figura IVA.2A) pertenece a la familia de sondas fluorescentes sensibles a la polaridad del entorno, por lo tanto puede ser utilizada para detectar cambios en las propiedades de fase de las membranas y para distinguir diferencias en el orden de los fosfolípidos a partir de cambios en la fluidez de la membrana, por su sensibilidad a los efectos de relajación del solvente.

El Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetil-aminonaftaleno) se localiza en la interfase de la bicapa con la porción ácido láurico alineada en paralelo con las cadenas acilo de los fosfolípidos y el residuo naftaleno, fluorescente, localizado al nivel del esqueleto glicerol (Figura IVA.2B). Cuando se inserta en membranas lipídicas, el Laurdan muestra características como: 1-corrIMIENTO del espectro de emisión dependiendo de la fase, hacia el azul en fase líquido-ordenada y hacia el rojo en fase desordenada (Figura IVA.3). Este efecto es atribuido a la reorientación de las moléculas de agua presentes en la interfase lipídica, cerca del Laurdan (proceso de relajación dipolar). 2-distribución equitativa en fase ordenada y desordenada.

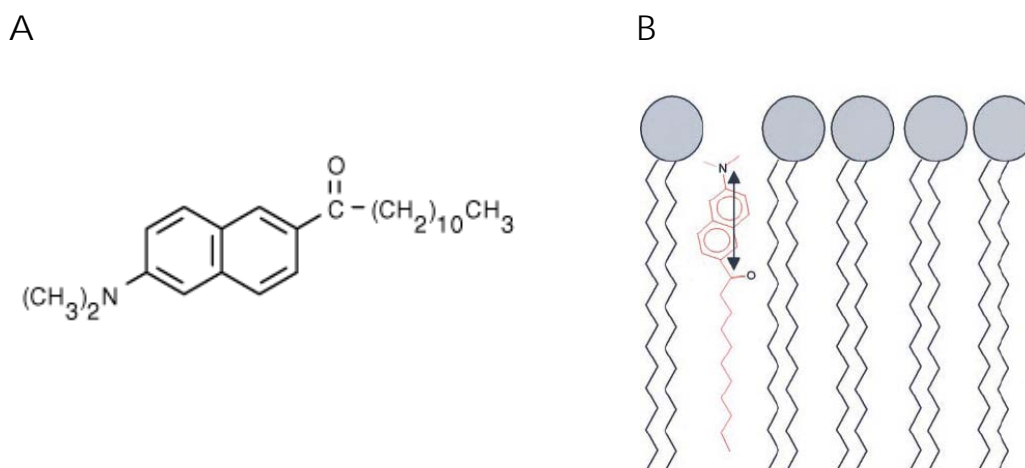


Figura IVA.2: A) Estructura del Laurdan. B) Esquema de localización del Laurdan en la membrana

El máximo de emisión de la sonda se corre aproximadamente 50 nm cuando la membrana pasa de un estado rígido a un estado fluido. El cambio representa distinto número y/o movilidad de moléculas de agua presentes a nivel del esqueleto del glicerol de los fosfolípidos (Parasassi, 1991), (Chong, 1993).

Variaciones en el contenido de agua en la membrana causan corrimientos en el espectro de emisión del Laurdan. Los cambios en el espectro de emisión asociados con la sensibilidad al solvente son cuantificados mediante el cálculo de GP (Parasassi, 1991). El valor de GP varía entre -1 y +1 (completa exposición al solvente y sin efecto del solvente, respectivamente). Altos valores de GP marcan una menor relajación dipolar lo cual indica un entorno más rígido.

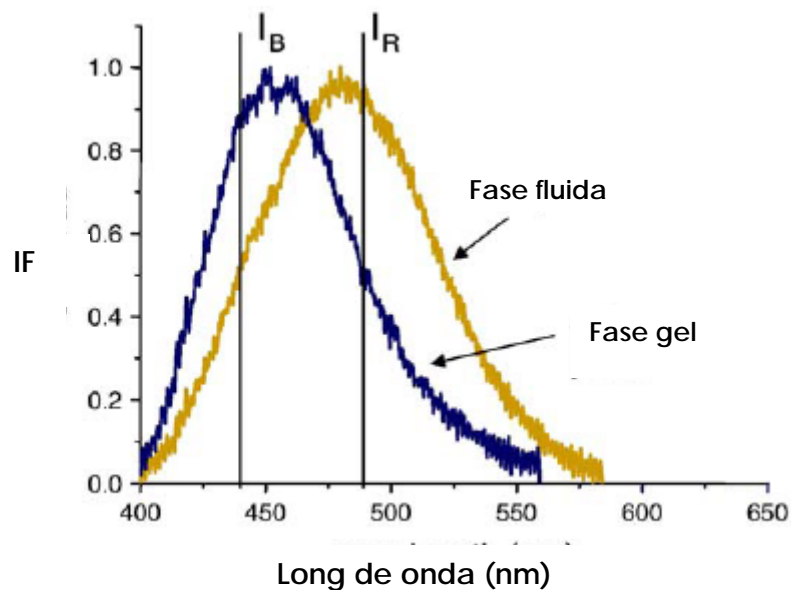


Figura IVA.3: Espectros de emisión del Laurdan en membranas en fase gel (azul) y en fase fluida (verde).

El valor de GP no refleja la movilidad del Laurdan, pero es influenciado por la movilidad local de moléculas polares. Para vesículas dispersadas en solución acuosa, el efecto de las moléculas polares en la vecindad de la sonda puede ser atribuido a moléculas de agua que

penetran a nivel de las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana (Parasassi, 1991), (Parasassi, 1994).

Suspensiones de LUVs-DMPC (50 μ M) preparados como se describió en el capítulo II, o LUVs-DMPC-LPS (en relación molar 3.5:1), incubados previamente por 30 minutos a 37°C, fueron equilibradas con Laurdan (2.5 μ M) a 45°C por 1 hora. La intensidad de fluorescencia del Laurdan y los espectros de GP se obtuvieron en un espectrofluorómetro SLM 4800 con una rendija de 8 nm para la emisión y la excitación. La longitud de onda de excitación utilizada fue 350 nm. Los valores de GP a cada temperatura fueron calculados a partir de las intensidades de emisión utilizando la siguiente ecuación adaptada del trabajo de Parasassi *et al* (Parasassi, 1991).

$$GP = \frac{I_{435} - I_{500}}{I_{435} + I_{500}} \quad (\text{Ec. IVA.2})$$

donde I_{435} e I_{500} se refieren al promedio de intensidades de emisión a cada longitud de onda. La relación molar sonda-lípidos utilizada fue 1:400. LUVs sin marca fueron utilizados para corregir el *scattering* de las muestras, que nunca excedió el 1%. La temperatura fue controlada por baño de circulación de agua y la homogeneidad de la muestra fue mantenida por agitación magnética continua.

Parte B: Visualización y análisis de la distribución de LPS en bicapas de fosfolípidos.

Los experimentos utilizando el microscopio de fluorescencia de dos fotones fueron realizados en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica, UCI, Irvine, California, bajo la supervisión de la Dra. Susana Sánchez.

IV.2B.1- Materiales.

LPS y LPS-FITC de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Chemical Co); dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) y dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC)

(Avanti, Polar Lipids); 6-dodecanoil-2-dimetilamino naftaleno (Laurdan) (Molecular Probes), Tritón X-100 (TX-100) (Sigma Chemical Co).

IV.2B.2- Preparación de vesículas unilamelares gigantes (GUVs).

Las vesículas unilamelares gigantes (GUVs) son un sistema modelo ampliamente utilizado para el estudio de diferentes aspectos físicos de las membranas. Una de las razones por las cuales los GUVs son un sistema modelo adecuado para estudios de microscopía de fluorescencia de dos-fotones es su tamaño ($\sim 50 \mu\text{m}$) ya que permite que vesículas individuales puedan ser observadas directamente usando las técnicas de microscopía. A su vez las GUVs, a diferencia de las MLVs, presentan homogeneidad de tamaño y forma.

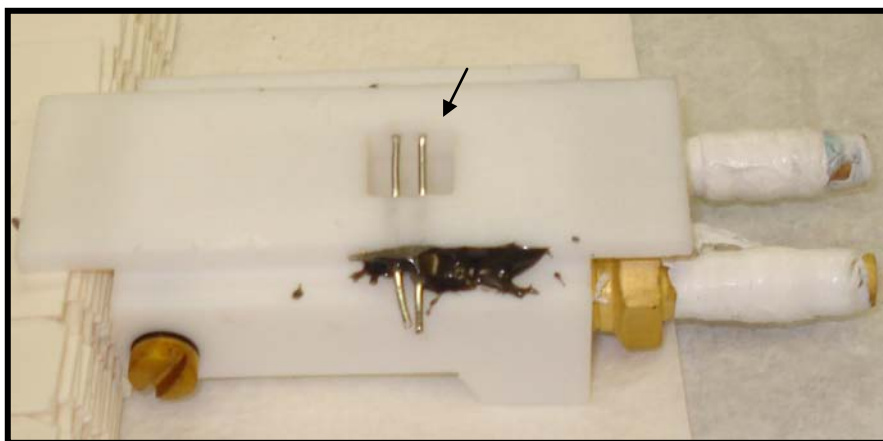


Figura IV2B.1: Fotografía de la cámara de crecimiento utilizada para la preparación de las GUVs. La flecha señala los alambres de platino donde se siembran las soluciones stock de fosfolípidos.

Para la preparación de los GUVs se utilizó el método de electroformación desarrollado por Angelova y Dimitrov (Angelova, 1986), (Dimitrov, 1987). Se utilizaron dos mezclas: DPPC:DOPC (1:1 mol:mol) y DOPC:DPPC:LPS-FITC (1:1:1 relación molar). Las soluciones se prepararon a una concentración total de lípidos de 0.2 mg/ml.

Aproximadamente 2 μ l de las soluciones de fosfolípidos fueron depositadas en cada alambre de platino (Pt) en la cámara de crecimiento (Figura IV2B.1); estos se secaron bajo nitrógeno y se liofilizaron por 1 hora, para remover los restos de solvente orgánico.

La cámara de crecimiento fue sellada con un cubreobjetos y fue termostalizada utilizando un baño de circulación de agua a la temperatura de crecimiento ($\approx 10^{\circ}\text{C}$ por encima de la transición de fase de la mezcla de fosfolípidos), luego se agregó buffer 1 mM Tris pH 8 (termostalizado a la temperatura de crecimiento) hasta cubrir los alambres de Pt (aprox. 4 ml). Inmediatamente después del agregado del buffer, los alambres de Pt fueron conectados a un generador de función (Hewlett-Packard, Santa Clara, CA) y se aplicó, por 30 minutos, un campo de baja frecuencia AC (función de onda sinusoidal con una frecuencia de 10 Hz y una amplitud de 2V). Una vez formados los GUVs se desconecta el campo AC y se disminuye la temperatura lentamente desde la temperatura de crecimiento (60°C) hasta la temperatura experimental deseada (25°C). La temperatura fue controlada dentro de la cámara de crecimiento al nivel de los alambres de Pt, utilizando una termocupla digital (modelo 400B, Omega, Stamford, CT). Para el seguimiento de la formación de GUVs y para la elección de una vesícula para las medidas de microscopía, se utilizó una cámara de video (CCD-Iris, Sony, San Diego, CA) acoplada al microscopio.

La sonda Laurdan se agrega a la muestra dentro de la cámara de crecimiento luego de que las vesículas se han formado. La sonda se utilizó en relación molar 1:100 (Laurdan:PL). Las vesículas se marcan homogéneamente con Laurdan, luego de 15 minutos de incubación.

IV.2B.3- Microscopía de dos-fotones de los GUVs.

El microscopio de fluorescencia de dos-fotones consta de un sistema de excitación en el cual el fluoróforo absorbe simultáneamente dos fotones incidentes y cada fotón provee la mitad de la energía

requerida para la excitación. Las ventajas de la excitación por dos fotones son menor *background*, menor *fotobleaching* y el efecto de seccionamiento que permite visualizar la morfología de superficie de dominios coexistentes en los GUVs.

Con el objetivo de visualizar la distribución del LPS y la organización lateral de los lípidos se obtuvieron imágenes de la superficie de los GUVs compuestos por DOPC:DPPC:LPS-FITC marcados con Laurdan, utilizando un microscopio de dos-fotones diseñado en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica (So, 1995), (So, 1996). Este sistema ha sido ampliamente utilizado para el estudio del comportamiento de fases de mezclas lipídicas artificiales y mezclas naturales de lípidos extraídos de membranas celulares (Tricerri, 2005), (Parasassi, 1997).

La visualización de la coexistencia de dominios se llevó a cabo utilizando una excitación con dos-fotones con luz polarizada, como fue descrito por Tricerri *et al* (Tricerri, 2005). Se utilizó un objetivo de aire LD-Achroplan con una distancia de trabajo de 20x (Zeiss, Holdale, NJ) con un número de apertura NA de 0.4. Como fuente de luz de excitación de dos-fotones se utilizó un láser de Titanio-Zafiro (Mira 900; Coherent, Palo Alto, CA) bombeado con un láser de doble frecuencia Nd:Vanadato, *setteado* a 780 nm. En el paso de excitación se colocó un *scanner* galvanométrico *x, y* (Cambridge Technology Watertown, MA) con la finalidad de obtener el escaneo de la fuente en ambas direcciones, *x* e *y*. La emisión de fluorescencia fue observada a través de filtros de ancho de banda desde 350 a 600 nm (filtro BG39, Chroma Technology, Brattleboro, VT). Para la detección de luz en el modo de conteo de fotones se utilizó un fotomultiplicador (R5600-P, Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Una versión comercial de la tarjeta diseñada en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica (ISS card) fue utilizada para la adquisición de las cuentas (Eid, 2000).

Un sistema de detección de dos-canales fue adosado para la obtención de imágenes de GP. La fluorescencia fue repartida en dos canales, rojo y azul, utilizando un separador dicróico Chroma Technology 470DCXR-BS, en el paso de emisión. Los filtros de interferencia (Ealing 440 y Ealing 490) fueron ubicados en los pasos de emisión para aislar las zonas roja y azul del espectro de emisión. Para la colección simultánea de las emisiones a 440 y 490 nm se utilizaron detectores separados para cada canal. Las imágenes roja y azul se colectan simultáneamente y luego se recombinan para formar la imagen de GP de la muestra, utilizando el programa SimFCS (Laboratorio de Fluorescencia Dinámica, Irving, CA). Las correcciones de la dependencia con la longitud de onda de los sistemas de detección de la emisión fueron llevadas a cabo a través de la comparación con valores de GP de una solución conocida (Laurdan en DMSO) (Bagatolli, 1999), (Sanchez, 2002) tomadas en un espectrofluorómetro (ISS Inc. Modelo PC1) y luego en el microscopio.

IV.2B.4- Fluorescencia del FITC-LPS.

El LPS-FITC fue utilizado para estudiar la distribución de la molécula de LPS en los liposomas (GUVs) a diferentes temperaturas.

Una vez obtenidos los GUVs compuestos de DOPC:DPPC:LPS-FITC se seleccionó una vesícula utilizando la cámara acoplada al microscopio. Se obtuvieron imágenes de intensidad de fluorescencia de FITC en la superficie de las vesículas (utilizando el canal con el filtro centrado en 490 nm, excitando a 780 nm). Se tomaron imágenes a dos temperaturas diferentes, 60°C y 25°C que corresponden respectivamente a temperaturas por encima y por debajo de la temperatura de transición de la mezcla de fosfolípidos.

IV.2B.5- Polarización generalizada del Laurdan e imágenes de GP.

Posteriormente, con la finalidad de obtener la imagen de GP de la misma vesícula en la que se observó la fluorescencia del FITC, se agregó Laurdan a la muestra. La imagen de GP se obtuvo a 25°C con el objeto de determinar la partición del LPS en los dominios existentes en las GUVs a dicha temperatura.

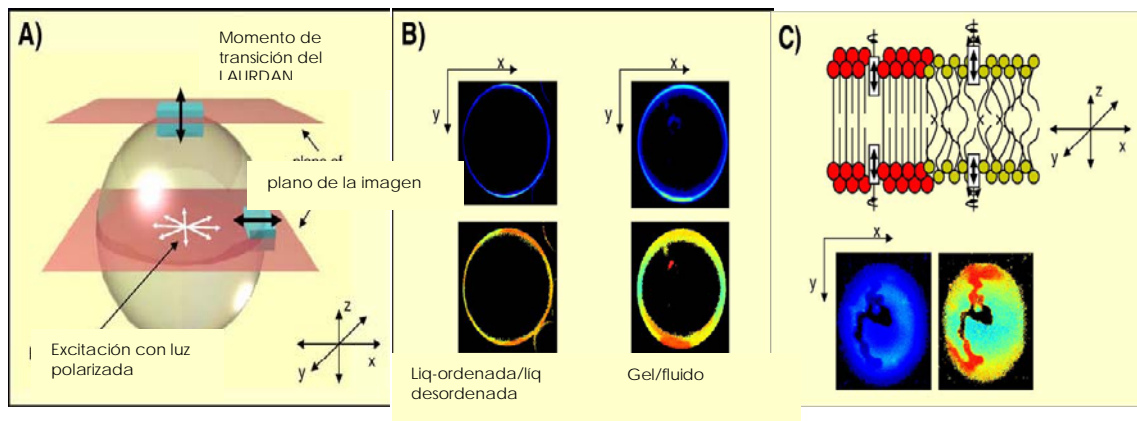


Figura IV2B.2: Efecto de fotoselección:

- A) Esquema de los GUV's y la posición del dipolo de transición del Laurdan.
- B) Región ecuatorial de las GUV's donde no hay efecto de fotoselección independientemente de la presencia o no de coexistencia de fases.
- C) Coexistencia de fases observada en la región polar de las vesículas. Hay un alto grado de fotoselección en la fase gel respecto al área de fase líquido-cristalina.

Como se mencionó anteriormente, el Laurdan es utilizado como sonda de membrana debido a su gran momento dipolar en el estado excitado, que resulta en su capacidad para reportar la penetración de agua en la superficie de la bicapa como resultado de los efectos de relajación dipolar (Weber, 1979). La penetración de agua puede correlacionarse con el empaquetamiento de los lípidos y la fluidez de la

membrana (Parasassi, 1991), (Parasassi, 1995). Además, cuando el Laurdan se inserta en una membrana, el dipolo de transición se alinea en paralelo con las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos permitiendo así el uso del efecto de fotoselección en las imágenes de microscopía para discriminar cualitativamente entre diferentes fases lipídicas (Figura IV2B.2).

Cuando las vesículas son excitadas con luz polarizada ocurre fotoselección en el plano de la luz de excitación, habiendo un fuerte nivel de excitación donde las moléculas se encuentran paralelas a la luz incidente, este efecto es particularmente notorio en el plano x-y que pasa a través del centro de la vesícula. Si se observan las regiones polares de las vesículas esféricas el efecto de fotoselección disminuye y se observan áreas poco iluminadas. Este efecto también depende del estado de fase de los fosfolípidos. En fase líquido-cristalina, debido a la movilidad de los lípidos, se pueden encontrar componentes del dipolo de transición paralelos a la excitación polarizada; en dominios en fase gel hay pérdida de fluorescencia debido a que los dipolos de excitación se encuentran perpendiculares al plano de incidencia de la luz. Por lo tanto, las áreas brillantes muestran dominios en fase líquido-cristalina y las áreas oscuras dominios en fase gel.

Las propiedades del espectro de emisión del Laurdan fueron ampliamente descritas en el inciso IV.2A.5. La emisión de fluorescencia del Laurdan en una bicapa en fase gel posee un corrimiento hacia mayores longitudes de onda (azul), comparado con la emisión en una bicapa en fase líquido-desordenada; esta propiedad permite la identificación de fase de los dominios lipídicos, directamente desde la imagen de GP. Para calcular los valores de GP en el microscopio de dos-fotones, se utiliza una longitud de onda de excitación de 780 nm y un sistema de dos canales con sus correspondientes filtros en la emisión (ver inciso IV2B.3). Las imágenes de GP se construyen a partir de las

imágenes de intensidad de fluorescencia obtenidas con los filtros de 440 nm y 490 nm (Figura IV2B.3).

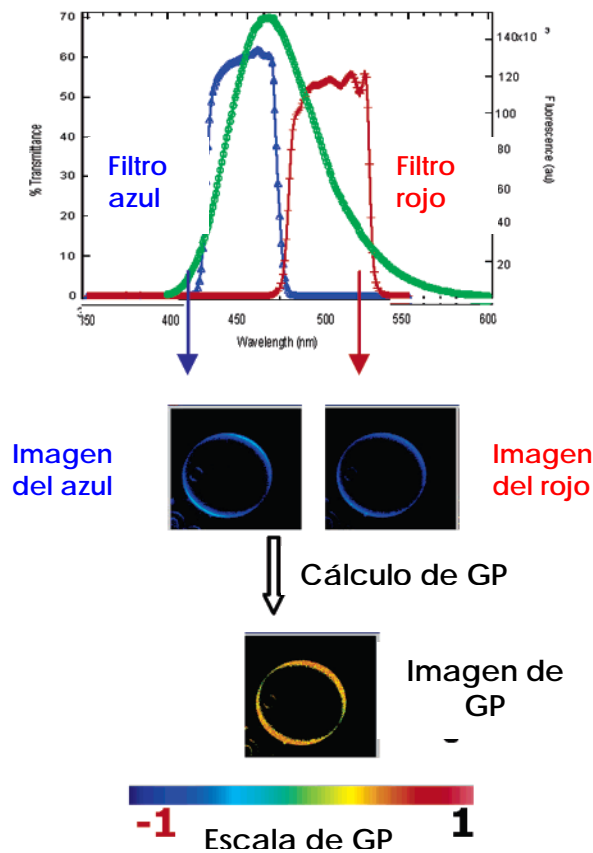


Figura IV2B.3: Esquema de la obtención de la imagen de GP.

Se utilizan detectores separados para coleccionar simultáneamente las emisiones roja y azul. Luego las imágenes con recombinadas para formar la imagen de GP.

Se obtienen dos imágenes simultáneas (256 x 256 *pixels*) de la vesícula observada (imagen del canal 1 e imagen del canal 2), una para cada región del espectro del Laurdan (Tricerri, 2005), (Parasassi, 1997). Ambas imágenes se procesan aplicando la fórmula de GP (Ec. IVA.2) a cada *pixel* de la imagen, utilizando el programa SimFCS. La imagen resultante puede ser representada en un histograma del número de *pixels* con una GP determinada. Cuando los GUVs presentan

una distribución de GP homogénea, el histograma de GP puede ajustarse a una distribución Gaussiana simple, donde el valor de GP en el centro de la distribución corresponde al valor promedio de GP. Los valores de GP poseen un rango entre -1 y +1, según la ecuación IVA.2 y se utiliza una escala de color para visualizar los *pixels* con diferente valor de GP.

Cuando las mezclas de lípidos presentan áreas con diferentes valores de GP, debido a la coexistencia de dominios, tanto el histograma como la imagen de GP pueden ser deconvolucionados en altos y bajos valores de GP, y el valor promedio de GP está dado por:

$$GP_{prom} = GP_1 \times f_1 + GP_2 \times f_2 \quad (Ec. IVB.1)$$

donde f_1 y f_2 corresponden a la contribución fraccional de los componentes con altos (GP_1) y bajos (GP_2) valores de GP.

Parte C: Comparación del efecto de la incorporación del LPS y colesterol en membranas.

IV.2B.6- Preparación de liposomas multilamelares conteniendo LPS.

Para la preparación de MLVs conteniendo LPS en la bicapa lipídica se procedió según el protocolo descrito por Dijkstra *et al* (Dijkstra, 1989). La mezcla de fosfolípidos DOPC:DPPC (1:1 relación molar, 2 mg/ml lípidos totales) en cloroformo se seca bajo nitrógeno. Luego los fosfolípidos se resuspenden en 0.2 ml de agua millie Q que contiene la cantidad de LPS a incorporar en los liposomas (1.7 mg, relación molar DOPC:DPPC:LPS 1:1:1). La suspensión se somete a tres ciclos de temperatura-sonicación (15 minutos a 45°C, 45 segundos de sonicación). Luego la solución se evapora en *speed-vac* hasta sequedad y finalmente se resuspende en buffer A (concentración final 2

mg/ml). El 99% del LPS agregado se incorpora en los liposomas (Dijkstra, 1989).

IV.2B.7- Ensayo de solubilización de liposomas.

Con la finalidad de determinar si la presencia del LPS en las membranas otorga resistencia a la solubilización por acción de detergentes, se realizaron ensayos de solubilización de liposomas en presencia de Tritón X-100.

Se utilizaron liposomas de tres composiciones diferentes: DOPC:DPPC (1:1 mol:mol) y DOPC:DPPC:colesterol (1:1:1 mol:mol:mol), preparados según lo descrito en el capítulo II y DOPC:DPPC:LPS (relación molar 1:1:1) preparados según inciso IV-2B.6.

Las suspensiones de MLVs (0.2 mg/ml) fueron equilibradas por 3 horas a 4°C, luego del agregado de Tritón X-100 en relación molar 3:1 detergente:lípidos. Se siguió el proceso de solubilización en el tiempo, observando la disminución de la turbidez.

La disminución de la turbidez se midió en un espectrofluorómetro SLM 4800, utilizando 500 nm como longitud de onda de excitación y de emisión. La muestra se mantuvo en agitación continua. Los valores de turbidez fueron normalizados utilizando la suspensión de MLVs como 100% de turbidez y el buffer como 0%.

IV.3- Resultados y Discusión.

Parte A: Estudios de la interacción de LPS en solución con sistemas modelo de membranas.

IV.3A.1- Medidas de Potencial Zeta.

Las medidas de Potencial Z se realizaron con el fin de estudiar la asociación entre el LPS y sistemas de membranas.

En la figura IV.3A.1 puede observarse que cuando los MLV-DMPC son expuestos al LPS hay un cambio en el valor original de Potencial Zeta (ζ) desde -13 mV hacia -27 mV y -57 mV, para las relaciones molares lípido:LPS 350:1 y 35:1 respectivamente. Estos cambios en los valores de Potencial Zeta indican un aumento en la carga neta negativa de los MLV-DMPC como consecuencia de la interacción del LPS con las membranas.

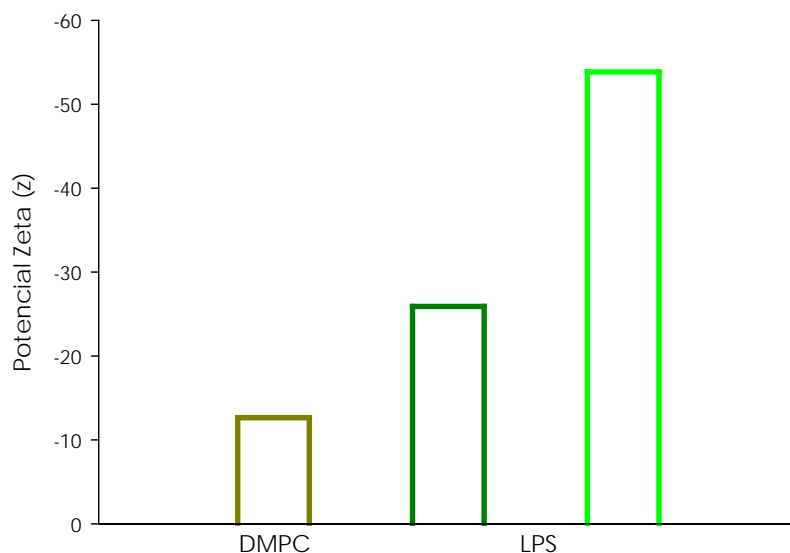


Figura IV.3A.1: Medidas de potencial Zeta (ζ) de MLV-DMPC (---) y MLV-DMPC en presencia de LPS en relación molar lípido:LPS 350:1 (---) y 35:1 (---)

El LPS está compuesto por:

- lípido A que posee seis cadenas hidrocarbonadas unidas a un disacárido de glucosamina bi-fosforilado, cargado negativamente que une al LPS a la capa externa de la membrana externa bacteriana,
- núcleo oligosacárido unido al lípido A vía el grupo KDO (ácido 3-deoxi-manooctulónico),
- antígeno O, cadena polisacáridica que se extiende hacia el medio circundante.

Los grupos fosfato presentes en el lípido A y los grupos fosfato y carboxilato del núcleo oligosacárido le brindan carga negativa a los liposomas de DMPC cuando el LPS interactúa con ellos.

IV.3A.2- Experimentos de FRET.

Los experimentos de FRET fueron realizados como ensayo de dilución de sondas, utilizando NBD-PE y Rh-PE como sondas fluorescentes (Struck, 1981), con la finalidad de caracterizar si el LPS se intercala en la bicapa lipídica. La intercalación en la membrana de moléculas no marcadas (en este caso el LPS) aumenta la distancia entre el donador y el aceptor, evidenciado por la reducción en la transferencia de energía, con un aumento en la intensidad de emisión del donador y una disminución en la intensidad de emisión del aceptor.

Los espectros de los liposomas doblemente marcados en presencia y ausencia de LPS se muestran en la Figura IV.3A.2. Luego de agregar LPS a la suspensión de LUVs-DMPC marcados con NBD-PE y Rh-PE, la intensidad de emisión del donador aumenta, indicando la incorporación del LPS en la membrana del liposoma, y por ende disminuye la eficiencia de FRET. La cinética del aumento en la intensidad de emisión es muy rápida, ocurre segundos después del agregado del LPS. Los experimentos fueron realizados utilizando la misma relación molar lípido-LPS usada en los experimentos de Potencial

Zeta (considerando que en los MLVs sólo un 10% de los lípidos están expuestos en la bicapa externa).

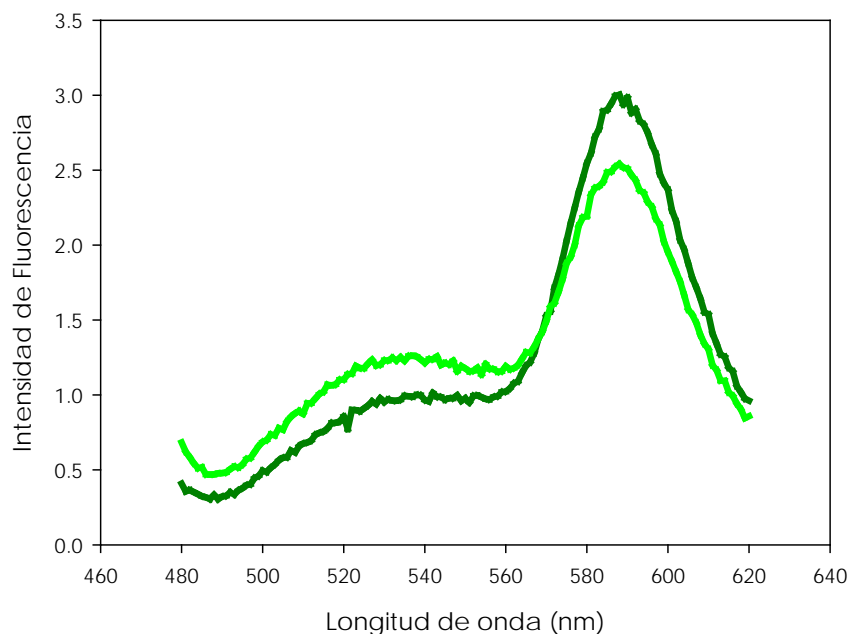


Figura IV.3A.2: Espectros de emisión de fluorescencia de LUVs-DMPC doblemente marcados con NBD-PE y Rh-PE en ausencia (--) y en presencia (--) de LPS en relación molar 3.5:1 lípido:LPS. Las muestras fueron excitadas a 465 nm (longitud de onda de excitación del NBD-PE) y el espectro de emisión se registró entre 480-600 nm.

En la figura IV.3A.3A puede observarse que la eficiencia de FRET es del 90 % luego de la incorporación del LPS a membranas de LUVs-DMPC, al agregar LPS en relación molar 35:1 lípido:LPS. Cuando la concentración de LPS se incrementa 10 veces, la eficiencia de FRET es del 65 %, considerando en ambos casos una eficiencia de FRET del 100% en ausencia de LPS.

Cuando el LPS es dispersado en una suspensión salina diluida, se agrega formando micelas. La CMC (concentración micelar crítica) del LPS de *E. coli* 0111:B4 determinada experimentalmente es 22 μg LPS/ml

(Aurell, 1998). Existe gran controversia en la literatura acerca de si el LPS interacciona con membranas en forma monómerica, como agregado o ambas, en particular en ausencia de LBP (Schromm, 1995), (Mueller, 2004).

Teniendo en cuenta la siguiente relación:

$$\Delta E/E_0 = \Delta S/S_0 = (-sLPS/sL) \times ([LPS]/[L]) \quad (EC. IV3A.1)$$

donde sL es la superficie de una molécula de lípido, $sLPS$ es la superficie de una molécula de LPS, ΔS es el aumento en la superficie de membrana (S_0) debido a la incorporación de una sola molécula de LPS en la membrana, $[LPS]$ es la concentración de LPS, $[L]$ corresponde a la concentración de lípidos, ΔE es el cambio en la eficiencia de FRET (E_0). La pendiente de la gráfica $\Delta E/E_0$ vs $[LPS]/[L]$ ($-sLPS/sL$) da la relación del aumento de superficie debido a una molécula de LPS comparada con el incremento producido por una molécula de lípido. Considerando que el peso molecular para el LPS de *E. coli* 0111:B4 es de 10 kDa, determinado por Aurell y Winstrom (Aurell, 1998), los valores de $(-sLPS/sL)$ calculados fueron 315 y 122,5 para las relaciones molares lípido:LPS 35:1 y 3.5:1 respectivamente. La no linealidad entre la concentración de LPS y la disminución de FRET, puede ser explicada si LPS monomérico que se encuentra en equilibrio con agregados por encima de la CMC a una concentración constante, se intercala en la membrana fosfolipídica.

Dado que el proceso de intercalación del LPS en membranas puede estar relacionado con la CMC, realizamos los mismos experimentos de FRET empleando lípido A, con menor CMC que el LPS y por lo tanto menor concentración de monómero, con el fin de discriminar si es el monómero o el agregado el que interactúa con las membranas.

Como se muestra en la Figura IV.3A.3B, la adición del lípido A a los liposomas, en la misma relación molar que se utilizó en los experimentos

de intercalación de LPS, no cambia la señal de FRET, por lo tanto puede considerarse que la intercalación del lípido A en los LUVs-DMPC es despreciable. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la intercalación del monómero en las membranas lipídicas es responsable de la disminución del FRET.

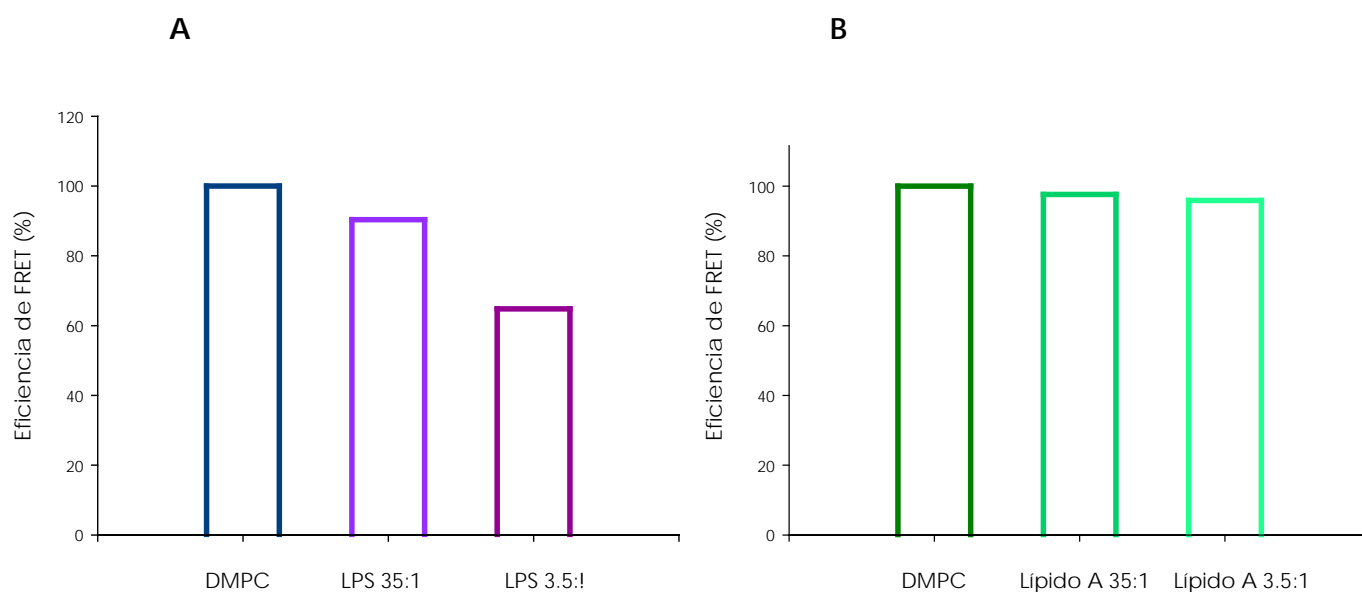


Figura IV.3A.3: Disminución de la eficiencia de FRET en LUVs doblemente marcados con NBD-PE y Rh-PE.

Panel **A**: LUVs-DMPC (100 μ mol) (---), LUVs-DMPC + LPS a 35:1 (lípidos:LPS, mol:mol) (---) y LUVs-DMPC + LPS 3.5:1 (lípidos:LPS, mol:mol) (---).

Panel **B**: LUVs-DMPC (100 μ mol) (---) LUVs-DMPC + lípido A 35:1 (lípidos:Lípido A, mol:mol) (---) y LUVs-DMPC + lípido A 3.5:1 (lípidos:Lípido A, mol:mol) (---)

A continuación se evaluó la dependencia entre el proceso de intercalación del LPS y la composición lipídica de la membrana. Como se muestra en la Figura IV.3A.4 la intercalación del LPS en liposomas de DMPC (lípidos neutros) provoca una eficiencia de FRET del 65 %. La presencia en los liposomas de 10% de PS (lípidos cargados negativamente) o 20 % de colesterol promueve una eficiencia de FRET del 78 % y 70 %, respectivamente. La presencia de cargas negativas en

la membrana, aportadas por la PS, disminuye la intercalación del LPS a causa de la repulsión electrostática entre ambas moléculas. Por otro lado, la presencia de colesterol modifica las propiedades físicas de las membranas disminuyendo el área por molécula de fosfolípido o área por cadena hidrocarbonada (A_{lc}) (McIntosh, 1989) y también aumenta el módulo de compresibilidad isotérmico (K_A) (Needham, 1990), ambos parámetros responsables de la disminución en la incorporación del LPS en las membranas, en comparación con liposomas de DMPC puro.

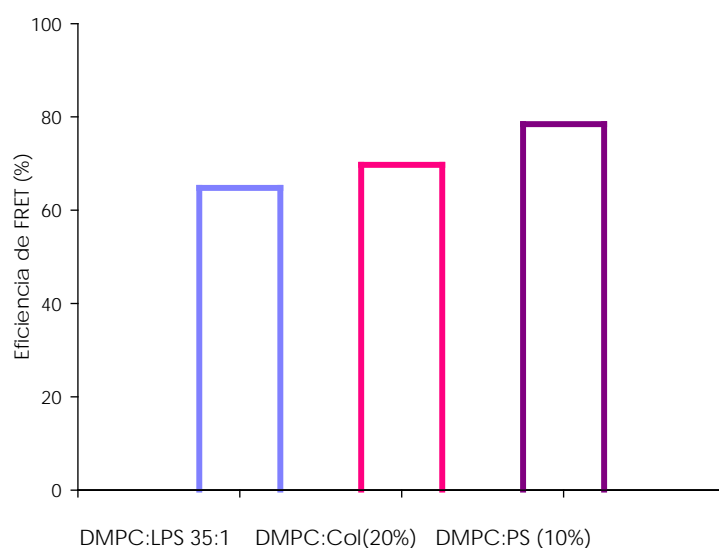


Figura IV.3A.4: Disminución de la eficiencia de FRET en LUVs doblemente marcados con NBD-PE y Rh-PE de diferente composición: LUVs-DMPC + LPS relación 3.5:1 (lípidos:LPS mol:mol) (--), LUVs-DMPC + 20% de colesterol (--), y LUVs- DMPC + 10% de PS (--).

IV.3A.3- Ensayos de *dequenching* del LPS-FITC.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los liposomas de desplazar el equilibrio agregado \rightarrow monómero, se utilizó LPS derivatizado con FITC. El FITC se conjuga con los grupos amino presentes en la estructura del LPS.

La fluorescencia del LPS-FITC en micelas de LPS se encuentra parcialmente apagada y esto es revertido durante la destrucción de los agregados, por ejemplo por la adición de detergentes (Wistrom, 1996). Un fenómeno similar es esperado cuando el LPS se incorpora en membranas de liposomas, si durante el proceso los monómeros de LPS se desplazan desde el agregado a la matriz lipídica del liposoma. La capacidad de auto-apagamiento de la fluorescencia del FITC unido covalentemente al LPS depende de la longitud de la cadena polisacáridica, siendo mayor el efecto en las especies de LPS con cadena polisacáridica más corta, debido a la proximidad de los residuos de fluoresceína dentro del agregado. El LPS-FITC de *E. coli* 0111:B4 utilizado en este trabajo de tesis posee una cadena polisacáridica larga y no mostró auto-apagamiento de la fluorescencia (Wistrom, 1996), por lo tanto no pudo cuantificarse la capacidad de los liposomas de desplazar el equilibrio por medio de ensayos de *dequenching* de la fluorescencia del FITC.

Sin embargo el ensayo permitió estimar cualitativamente, la capacidad de los liposomas de desplazar el equilibrio agregado → monómero, comparando los espectros de LPS-FITC en presencia de liposomas con los obtenidos en presencia de DOC, ya que está descrito que el LPS se desagrega en presencia de 0.2% DOC. Además la presencia de EDTA en el buffer, que se coordina con los cationes divalentes, aumenta la dispersión de las moléculas de LPS por repulsión de cargas (Shauds, 1980).

La figura IV.3A.5 muestra los espectros de LPS-FITC luego de la adición de deoxicolato (DOC) en buffer con EDTA (A) y LUVs-DMPC (B). En ambos casos, presencia de DOC y presencia de LUVs-DMPC, una disminución en la intensidad de fluorescencia y un pequeño corrimiento (1 nm) del máximo del espectro hacia mayores longitudes de onda fueron observados, indicando un entorno más polar de la sonda FITC

que puede deberse a la fluorescencia de monómeros liberados de agregados de LPS-FITC.

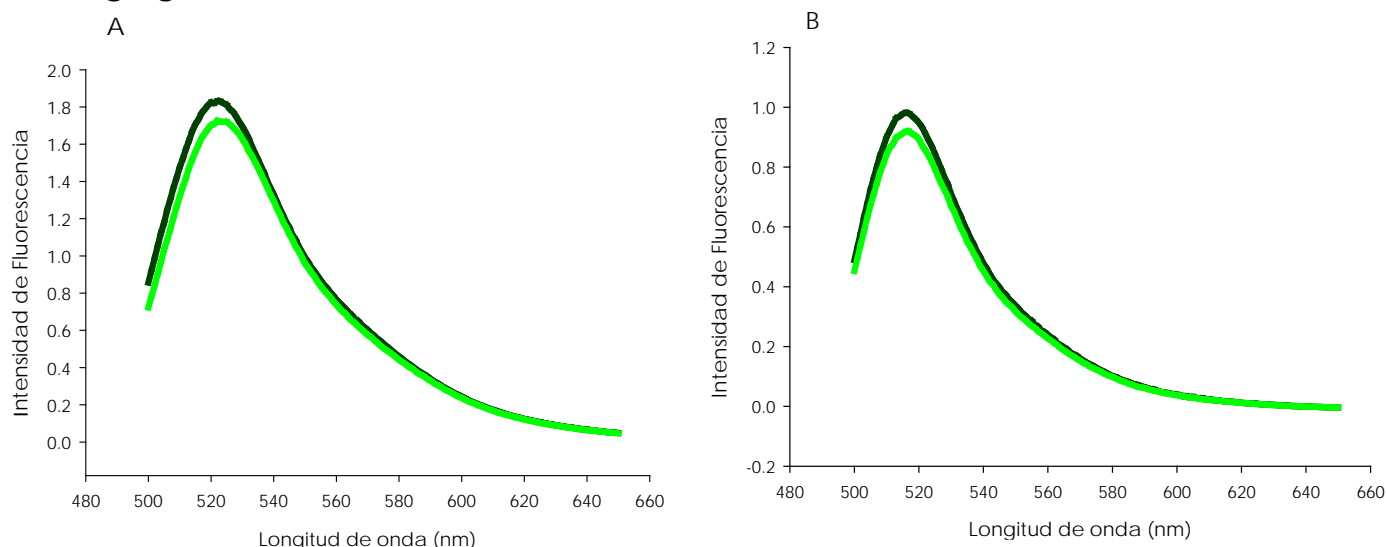


Figura IV.3A.5: Espectros de emisión de fluorescencia de LPS-FITC de *E. Coli* 0111:B4.

Panel(A) LPS-FITC en buffer A en ausencia (--) y en presencia de (--) DOC 0.2%

Panel(B) LPS-FITC en buffer A en ausencia (--) y en presencia de (--) LUVs-DMPC 50 μ M.

Los espectros de emisión del LPS-FITC (500-650 nm) fueron medidos a 37°C. Las muestras fueron excitadas a 460 nm.

IV.3A.4- Polarización generalizada del Laurdan (GP).

Con el fin de estudiar si el LPS produce algún efecto a nivel de la interfase hidrofílica-hidrofóbica de la membrana, se utilizaron LUVs-DMPC marcados con Laurdan y se midió la polarización generalizada (GP) de la sonda, en presencia y ausencia de la endotoxina.

La figura IV.3A.6 muestra la dependencia de los valores de GP con la temperatura. Como es de esperar, para LUVs-DMPC, la GP de la sonda disminuye de un valor de 0.45, a temperaturas correspondientes a la fase gel de los lípidos, hasta un valor de - 0.31 para la fase líquido-

cristalina. En presencia de LPS, los valores de GP obtenidos son muy similares, comparados con los valores para DMPC puro, tanto en fase gel como en fase líquido-cristalina, indicando que la presencia de LPS no promueve modificaciones a nivel de la interfase hidrofílica-hidrofóbica.

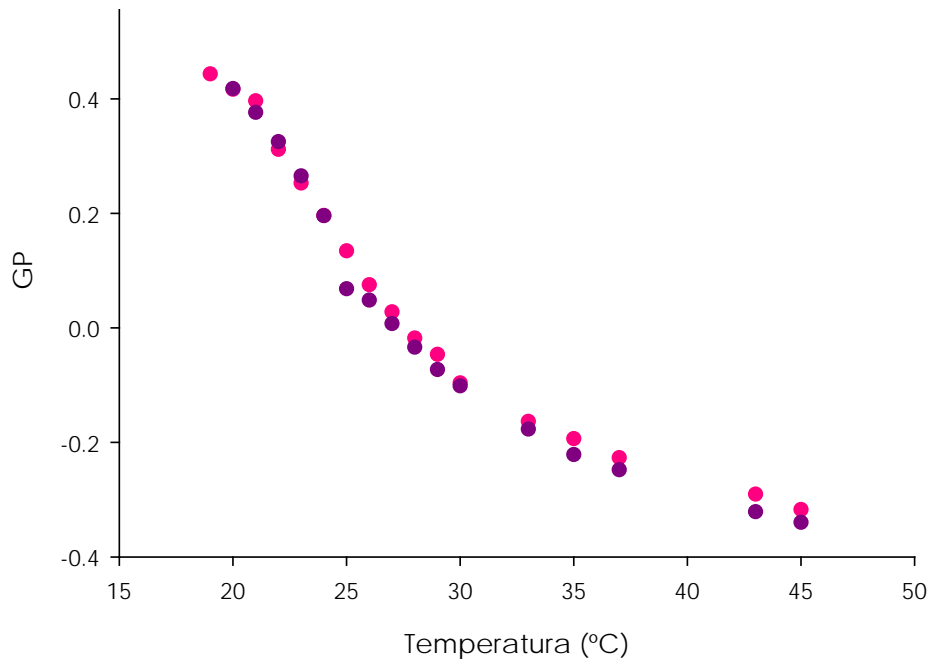


Figura IV.3A.6: Perfil de valores de GP en función de la temperatura para muestras de LUVs-DMPC (●), y de LUVs-DMPC en presencia de LPS de *E. Coli* 0111:B4 en relación molar 35:1 lípido-LPS (●).

Un factor que influye en la organización de la membrana es la presencia de solutos hidrofílicos que modifiquen la entropía a través de cambios en la estructura ordenada del agua (Bianco, 1988), (Johnston, 1984). El LPS se inserta en la membrana por medio del lípido A y expone una región altamente hidrofílica en la interfase lípido-agua. Una posible explicación para la similitud del comportamiento del Laurdan en

presencia y ausencia de LPS en la bicapa sería que todas aquellas moléculas de agua presentes en la interfase que podrían tener acceso a la membrana por la presencia de defectos, quedan adsorbidas en la porción altamente polar del LPS y de esa forma no ingresan a la membrana y no modifican las propiedades de GP de la sonda.

Estudios con sondas solvatocrómicas demostraron que la micropolaridad interfacial se torna más polar en bicapas que contienen glicoesfingolípidos, comparado con bicapas de fosfolípidos puros (Maggio, 2004), (Montich, 1985). Estas observaciones fueron confirmadas por medio de estudios de la polarización generalizada (GP) de la sonda Laurdan, que demostraron que en una interfase más hidratada tanto en fase gel como en fase líquido-cristalina de glicoesfingolípidos, la sonda es insensible para determinar transición o coexistencia de fases en estos sistemas (Bagatolli, 1997).

Bagatolli *et al* (Bagatolli, 1997) demostraron que en mezclas de fosfolípidos y glicoesfingolípidos tanto los valores de GP como las pendientes de las curvas de GP en función de la temperatura son similares a los observados en vesículas de fosfolípidos puros y contrasta con la pendiente plana de la transición en bicapas de glicoesfingolípidos puros. Estos resultados sugieren que en las mezclas el Laurdan particiona preferentemente en fases enriquecidas en fosfolípidos y por ende el comportamiento del Laurdan refleja los cambios de fase de dichos dominios. En los experimentos realizados en vesículas de DMPC se observa el mismo comportamiento del Laurdan respecto a vesículas con el agregado de LPS, los valores de GP y las pendientes de las curvas de GP en función de la temperatura son similares, pudiendo compararse el comportamiento del LPS en las membranas, a lo observado para las membranas con glicoesfingolípidos.

De los experimentos realizados en esta sección podemos concluir que:

- el LPS se asocia a las membranas lipídicas compuestas de fosfolípidos neutros, desplazando el valor de Potencial Zeta a valores más negativos.
- la interacción observada no es una mera absorción superficial sino, como lo demuestran los experimentos de FRET, el LPS se intercala entre los fosfolípidos.
- el LPS se intercala como monómero, pudiendo los liposomas desplazar el equilibrio agregado → monómero.
- la intercalación del LPS en las membranas es dependiente de su composición ya que la presencia de PS o colesterol en la bicapa disminuye la intercalación.

Estos resultados nos permiten hipotetizar sobre el aporte de la matriz lipídica de las lipoproteínas en el efecto neutralizante de la endotoxina, mediado por el enmascaramiento del lípido A en la matriz lipídica de las HDL.

Parte B: Visualización y análisis de la distribución de LPS en bicapas de fosfolípidos.

IV.3B.1- Observación de la incorporación del LPS en bicapas fosfolipídicas, por microscopía de fluorescencia de dos-fotones y fluorescencia del FITC.

Para la observación de la incorporación y distribución del LPS en las membranas, se crecieron GUVs de DOPC:DPPC:FITC-LPS (relación molar 1:1:1) a 60°C, como se describió en Materiales y Métodos (inciso IV.2B.2), y fueron analizadas por microscopía de fluorescencia de dos-fotones.

Como primera aproximación se observó la fluorescencia del FITC. La Figura IV3B.1 muestra la imagen de fluorescencia tomada a la superficie de una de las GUVs. La superficie aparece homogéneamente fluorescente. Debido a que la única molécula fluorescente en la

cámara de crecimiento es el LPS-FITC, este resultado indica que el LPS es incorporado en la bicapa lipídica durante el crecimiento de las GUVs. Además demuestra que a la temperatura de crecimiento (60°C), donde los lípidos se encuentran por encima de su temperatura de transición de fase (T_t), el LPS se distribuye homogéneamente en la bicapa.

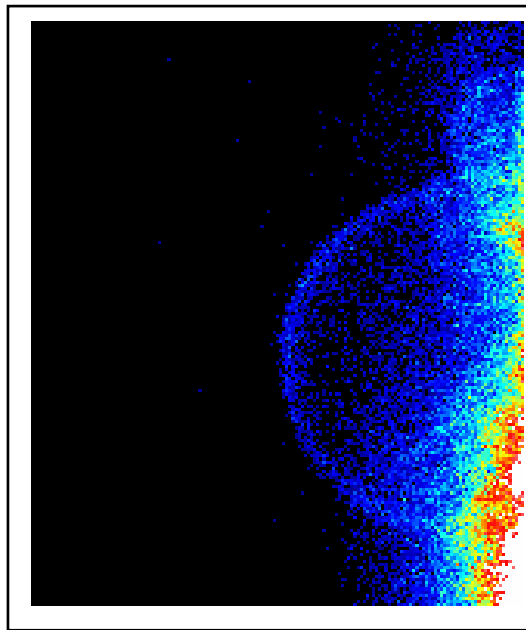


Figura IV3B.1: Imagen de microscopía de dos-fotones de la fluorescencia del FITC en la superficie de GUVs compuestas de DOPC:DPPC: LPS-FITC. La imagen fue tomada a 60°C, donde ambos lípidos se encuentran en fase líquido-cristalina. Puede observarse una distribución homogénea de la fluorescencia del FITC en la superficie de la vesícula. La relación molar de los lípidos utilizada fue 1:1:1.

Luego de tomar la fotografía a 60°C, la temperatura de la cámara de crecimiento fue lentamente disminuida hasta llegar a 25°C, y se tomó una nueva fotografía de la vesícula. En contraste con la distribución homogénea del LPS en el sistema en fase líquido-cristalina, a

25°C puede observarse una localización preferencial de las moléculas de LPS en áreas específicas de las GUVs (Figura IV3B.2A). A 25°C, el LPS se encuentra por debajo de su temperatura de transición de fase gel/líquido-cristalina, determinada entre 30-37°C para los LPS de enterobacterias (Brandenburg, 1990).

Con el objetivo de caracterizar la naturaleza de los dominios en los cuales el LPS se encuentra selectivamente concentrado, las vesículas fueron incubadas con Laurdan y se tomaron imágenes de GP de la vesícula observada por fluorescencia del FITC. La presencia de LPS marcado no interfiere en las medidas de GP.

La figura IV3B.2B, muestra la imagen de GP de la vesícula y permite identificar a la región donde el LPS se localiza preferencialmente a 25°C, como una región de alto valor de GP. Estas áreas están enriquecidas en DPPC, lípido que a 25°C se encuentra por debajo de su T_t .

El Laurdan se localiza en la región hidrofóbica de la bicapa fosfolipídica y particiona de igual manera entre las diferentes fases (gel y líquido-cristalina). El espectro de emisión de la sonda es sensible al grado de alineamiento de las cadenas acilo dentro de la bicapa, y por lo tanto esta sonda puede ser utilizada para identificar fases lipídicas (Bagatolli, 1999), (Bagatolli, 2000), (Parasassi, 1990). Utilizando este sistema y considerando: las ventajas del efecto de seccionamiento de la microscopía de fluorescencia de dos-fotones y la capacidad de tomar valores instantáneos de polarización generalizada (GP), se visualizó la morfología de superficie de dominios coexistentes en las GUVs. Se tomó una imagen en el centro de las vesículas esféricas y se observó un anillo fluorescente, correspondiente a la emisión del Laurdan, con un área central no fluorescente (debido a que el Laurdan no fluoresce en agua).

Con el objetivo de caracterizar la coexistencia de dominios, se enfocó el microscopio hacia el centro de las vesículas y se tomó la

imagen de GP a 25°C (como se describió en Materiales y Métodos). Cuando los dominios lipídicos son mayores que el tamaño del píxel en la imagen y la luz de excitación utilizada es circularmente polarizada, pueden diferenciarse dominios lipídicos más ordenados y menos ordenados en la región apical de la vesícula. Esto puede diferenciarse debido a que el efecto de fotoselección hace que los dominios más ordenados aparezcan menos fluorescentes y los dominios menos ordenados se vean más fluorescentes.

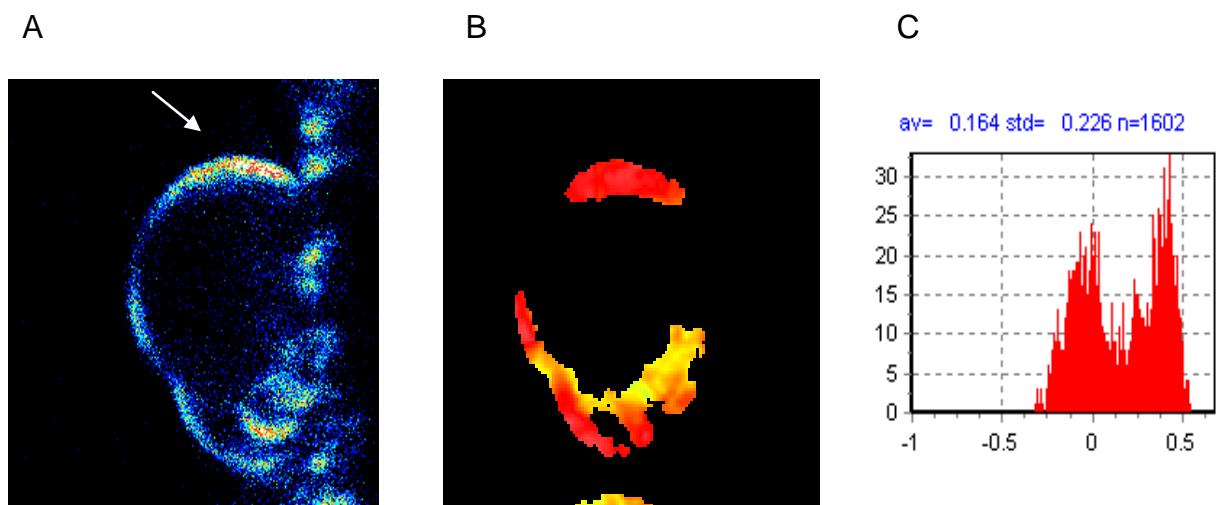


Figura IV3B.2: Visualización de la distribución del LPS en GUVs de DOPC:DPPC:FITC-LPS por microscopía de fluorescencia de dos-fotones.

A) Fluorescencia del FITC de la vesícula. B) Imagen de GP tomada en el centro de la vesícula. C) Histograma de GP asociado a la imagen del panel B.

La fluorescencia del FITC se localiza en dominios de la superficie de la vesícula (señalada con la flecha blanca en el panel A). Esos dominios son sólidos, determinado por GP (panel B).

La relación molar de DOPC:DPPC:FITC-LPS utilizada fue 1:1:1. Las imágenes fueron tomadas a 25°C, donde se produce coexistencia de fases.

Hay muchas evidencias que indican la coexistencia de fases gel y fluida en estas vesículas. Cuando dominios fluidos se encuentran en un

entorno fluido, la forma esférica de los dominios se da debido a que ambas fases son isotrópicas y la línea de tensión, la cuál está asociada al borde de dos fases no mezcladas, está minimizada por la optimización de la relación área-perímetro. Este no es el caso de las GUVs compuestas por DOPC:DPPC:LPS.

Además del efecto de fotoselección, los dominios menos ordenados poseen un corrimiento de la emisión hacia el rojo, comparado con los dominios más ordenados. De esta manera, cuando la emisión se observa con filtros de interferencia centrados en 490 nm, los dominios menos ordenados se ven más intensos que cuando son observados con filtros centrados a 440 nm. En la sección polar de los GUVs el dipolo de transición del Laurdan en la fase ordenada se encuentra orientado perpendicularmente a la luz incidente (láser) y por lo tanto el Laurdan en estas fases no contribuye a la señal de fluorescencia.

Finalmente, debido a que el Laurdan se encuentra homogéneamente distribuido entre las fases sólidas y fluidas de los fosfolípidos (Bagatolli, 1999), (Bagatolli, 2000), la polarización generalizada (GP) medida en las secciones ecuatoriales de los GUVs, donde todas las moléculas de Laurdan pueden estar excitadas, pueden ser utilizadas para discriminar entre dominios más ordenados (alto GP) y menos ordenados (bajo GP) (Dietrich, 2001), como se muestra en la en la Figura IV3B.2B. El histograma de los valores de GP (Figura IV3B.2C) se ajusta a una distribución bimodal, debido a que las imágenes de fluorescencia indican la coexistencia de dos fases con diferentes valores de GP. El histograma corresponde a la distribución de los valores de GP por píxel en las imágenes de GP, y a partir del histograma se puede obtener un valor promedio de polarización generalizada. En el caso de coexistencia de dos fases, el histograma puede ser separado en dos valores promedio de GP, uno para cada fase. Las regiones más

ordenadas, con mayor polarización, corresponden a regiones con bajo contenido de agua (valores altos de GP).

IV.3B.2- Efecto del LPS en la dependencia de la función GP con la temperatura, observado por microscopía de fluorescencia de dos-fotones.

Con la finalidad de observar la dependencia de GP en función de la temperatura y la transición de fase de las GUVs compuestas por DOPC:DPPC:LPS en comparación con la mezcla binaria DOPC:DPPC, se tomaron imágenes de GP a diferentes temperaturas utilizando el microscopio de fluorescencia de dos-fotones.

Las imágenes de microscopía de las vesículas compuestas por cantidades equimolares de DOPC y DPPC muestran la presencia de regiones con diferentes valores de GP, tal cual fue descrito previamente por Parasassi *et al* (Parasassi, 1997). El mismo comportamiento fue observado en las GUVs conteniendo LPS en su composición (Figura IV3B.3A). A altas temperaturas, las vesículas poseen una única fase uniforme. Disminuyendo la temperatura se observa la separación de fases a partir de la temperatura de transición (Veatch, 2004), como se muestra en la Figura IV3B.3B.

Las vesículas de composición binaria (DOPC:DPPC 1:1) poseen, a bajas temperaturas, coexistencia de dominios rígidos y fluidos (alto y bajo GP, respectivamente) pero los dominios rígidos, que se encuentran preferentemente excitados por la luz polarizada, poseen valores de GP menores respecto a los dominios puros en fase gel. Para estas vesículas de composición binaria, la coexistencia de fases se observa claramente en las imágenes de GP (Parasassi, 1997). En presencia de coexistencia de fases en las GUVs de composición binaria, la región del rojo del espectro de excitación corresponde a las moléculas de Laurdan rodeadas por fosfolípidos en fase gel y a medida que se aumenta la

longitud de onda de excitación, más moléculas de sonda en estado no relajado (que emiten en el azul) son excitadas.

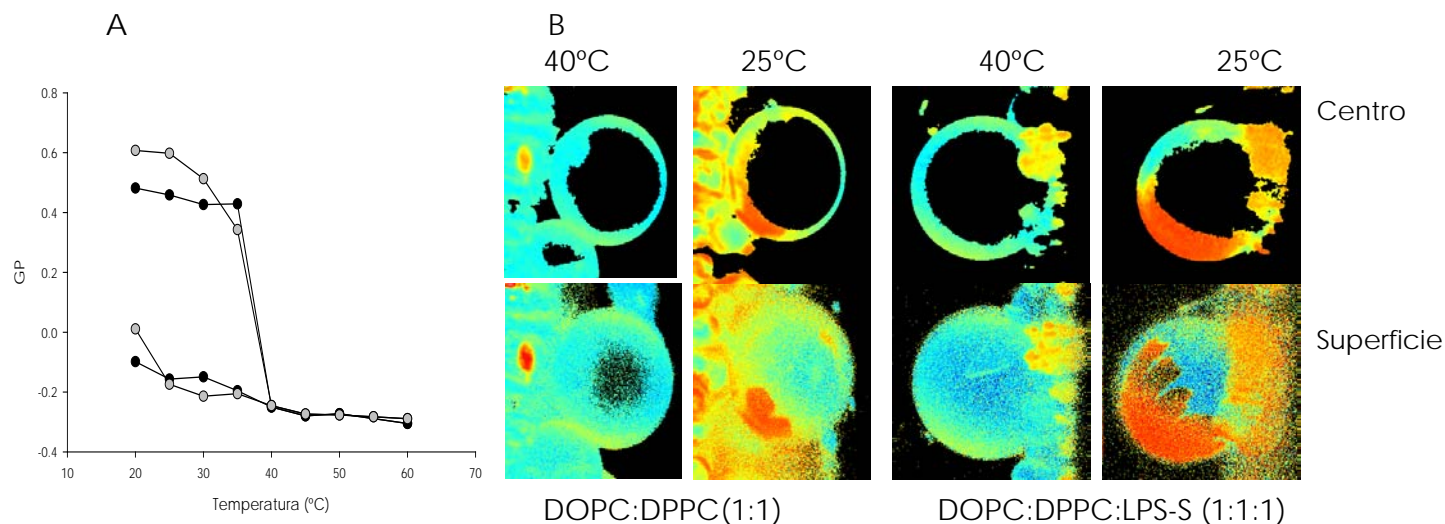


Figura IV3B.3: Análisis de las propiedades de GP de GUVs en presencia de LPS.

A) Cambios de GP en función de la temperatura de GUVs compuestas de DOPC:DPPC (1:1) (●) y DOPC:DPPC:LPS-S (1:1:1) (○).

Por encima de la temperatura de transición de fase los lípidos se encuentran en fase líquido-cristalina y hay un único valor de GP, a temperaturas por debajo de la transición hay coexistencia de fases y hay dos valores de GP.

B) Imágenes de GP tomadas desde el centro y desde la superficie de las vesículas, por encima (40°C) y por debajo (25°C) de la transición de fases.

Los resultados de GP obtenidos por microscopía de dos fotones confirman lo observado por fluorescencia en LUVs-DMPC incubados con LPS, donde tampoco se observaron diferencias en el comportamiento de la sonda en la interfase hidrofílica-hidrofóbica en presencia de LPS en la membrana.

Parte C: Comparación de las propiedades de membranas conteniendo LPS o colesterol.

IV.3C.1- Ensayos de solubilización de liposomas por acción de detergentes.

Los detergentes son herramientas importantes en el estudio de la estructura de las membranas biológicas ya que pueden solubilizar, diferencialmente, dominios de membrana en diferentes estados físicos. La insolubilidad en detergentes como el Tritón X-100 es observada en regiones de las bicapas lipídicas que existen en un estado físico en el cual hay un alto empaquetamiento lipídico. Esta propiedad ha sido utilizada para apoyar la hipótesis sobre la existencia en las membranas de dominios biológicos con diferente composición lipídica. Hay muchas observaciones que sugieren que el Tritón X-100 no puede empaquetarse estrechamente entre cadenas acilo saturadas y como resultado de ello, a bajas temperaturas las interacciones lípido-lípido entre las cadenas acilo altamente empaquetadas son mucho más fuertes que las interacciones lípido-Tritón X-100.

Con el objetivo principal de comparar si los dominios formados por LPS en las membranas tienen un comportamiento similar a aquellos formados por el colesterol, se llevaron a cabo experimentos de cinética de solubilización de liposomas compuestos por DOPC:DPPC, DOPC:DPPC:LPS y DOPC:DPPC:Col por acción de Tritón X-100. La disminución de la dispersión de luz de los liposomas en el tiempo, luego del tratamiento con detergente, es el modo más sencillo de evaluar la solubilización de los lípidos.

Como puede observarse en la Figura IV3C.1, durante el proceso de solubilización por Tritón X-100 (3:1 detergente:lípido, relación molar), a 4°C, la turbidez disminuye en un 10% en las mezclas ternarias (DOPC:DPPC:LPS, DOPC:DPPC:Col) en comparación con la disminución del 60 % observada en liposomas de composición binaria (DOPC:DPPC). Los experimentos de solubilización muestran claramente que tanto el LPS como el colesterol confieren a los liposomas resistencia a la solubilización por Tritón X-100.

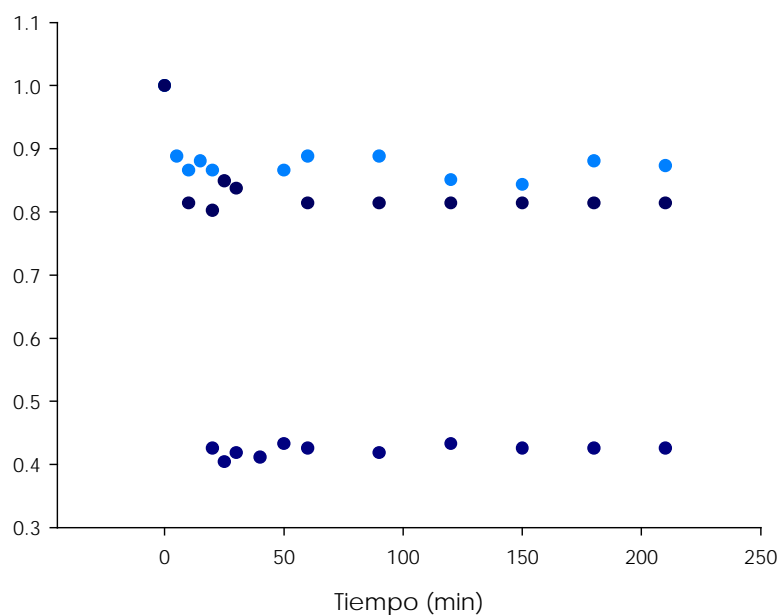


Figura IV3C.1: Efecto del LPS en la solubilización de vesículas por Tritón X-100. MLVs de DOPC:DPPC (relación molar 1:1)(●) y DOPC:DPPC:LPS (relación molar 1:1:1)(●) y DOPC:DPPC:Col (1:1:1 molar ratio)(●) en buffer A, tratadas con Tritón X-100. La relación molar detergente:lípido utilizada fue 3:1.

La disminución de la turbidez fue medida por dispersión de luz en un espectrofluorómetro SLM 4800 a una longitud de onda de excitación y de emisión de 550 nm. Las medidas fueron realizadas a 4°C, en función del tiempo. Las curvas fueron normalizadas a 1 para su comparación.

La resistencia a la solubilización por detergentes se encuentra relacionada con el empaquetamiento molecular de los lípidos (Schroeder, 1994), bicapas en estado líquido-ordenado muestran ser menos susceptibles a la solubilización respecto a bicapas en estado líquido-desordenado (Ahyayauch, 2006). La resistencia a la solubilización por Tritón X-100 cuando el colesterol está presente en la membrana está relacionada a las propiedades estructurales y mecánicas de la bicapa. Como se mencionó anteriormente, la introducción de colesterol en las

membranas reduce el área por molécula de fosfolípido y aumenta el área del módulo de compresibilidad isotérmica (K_a) (Needham, 1990). Del mismo modo que el colesterol, el LPS disminuye el área por molécula de fosfolípido o área por cadena hidrocarbonada (A_{lc}). El área por cadena hidrocarbonada medido para el LPS es de 26 \AA^2 (Snyder, 1999), valor comparable al A_{lc} determinado para mezclas completamente hidratadas de EPC:colesterol 1:1 (26 \AA^2) (McIntosh, 1989) pero es pequeño comparado con el área por cadena hidrocarbonada determinada para fosfolípidos con cadenas insaturadas típicos de las membranas biológicas, el cuál varía entre 32 \AA^2 y 41 \AA^2 (Tristram-Nagle, 1998).

Datos publicados por Allende *et al.* (Allende, 2003) demostraron que el colesterol en las membranas plasmáticas eucariotas y el LPS en la pared celular de las bacterias Gram negativas, proveen de una fuerte protección a los efectos líticos del péptido melitina argumentando que dicha resistencia se debe, en parte, al empaquetamiento similar entre las cadenas acilo en las bicapas de PC:colesterol y de LPS.

Otra posible explicación a la similar resistencia a la solubilización por Tritón X-100 de las bicapas que contienen LPS o colesterol, puede ser la dependencia de las estructuras formadas por los lípidos y los detergentes con la forma de las moléculas (Gennis, 1989). Es conocido que la formación de micelas requiere moléculas con forma de cono en las cuales el grupo de la cabeza polar ocupa un espacio mayor que la porción hidrocarbonada. Tanto el colesterol como el lípido A (región de la molécula del LPS que se inserta en las membranas) tienen forma de cono invertido (Schromm, 2000) donde la cadena hidrocarbonada ocupa mayor espacio que la cabeza polar, por lo tanto estas moléculas pueden formar estructuras dentro de la bicapa lipídica con formas que no son favorables para la formación de micelas, otorgando así resistencia a la solubilización por Tritón X100. DOPC y DPPC poseen

forma cilíndrica y como es de esperarse ambos presentan baja resistencia a la solubilización por Tritón X-100 a 4°C.

A su vez, como se mencionó anteriormente, el LPS utilizado en este trabajo de tesis (S-LPS, *wild-type*) posee una cadena polisacáridica denominada antígeno O unido al lípido A que puede estar actuando como una barrera estérica inhibiendo la interacción con el detergente y de este modo impone resistencia a la solubilización.

IV.3C.2- Empaquetamiento de los lípidos en membranas que contienen LPS o colesterol.

Con el objetivo de comparar el efecto de la incorporación del LPS y del colesterol en la bicapa, se tomaron imágenes de GP a las mezclas DOPC:DPPC:LPS y DOPC:DPPC:Col en comparación con la mezcla DOPC:DPPC usada como control (Figura IV3C.2). Las imágenes fueron tomadas a dos temperaturas diferentes, 55°C donde todos los lípidos de la mezcla se encuentran por encima de su T_t y 25°C, temperatura a la cual DPPC y LPS se encuentran por debajo de su T_t.

El valor promedio de GP se observa en el gráfico de barra y la forma de los dominios se muestra en las imágenes tomadas desde la superficie de las GUVs. A 55°C, no se observa segregación de los lípidos. El valor de GP para la mezcla que contiene colesterol es mayor que el de la mezcla binaria usada como control, estos valores también han sido reportados anteriormente (Sanchez, 2007). Para la mezcla que contiene LPS no se observaron diferencias en el valor de GP respecto a la mezcla binaria.

Un comportamiento similar fue observado a 25°C, donde ocurre la segregación de fases. Se obtuvieron dos valores de GP, uno para cada fase y dichos valores son similares para la mezcla binaria control y la mezcla que contiene LPS; sin embargo en presencia de colesterol los valores de GP son mayores especialmente en la fase de alto valor de GP.

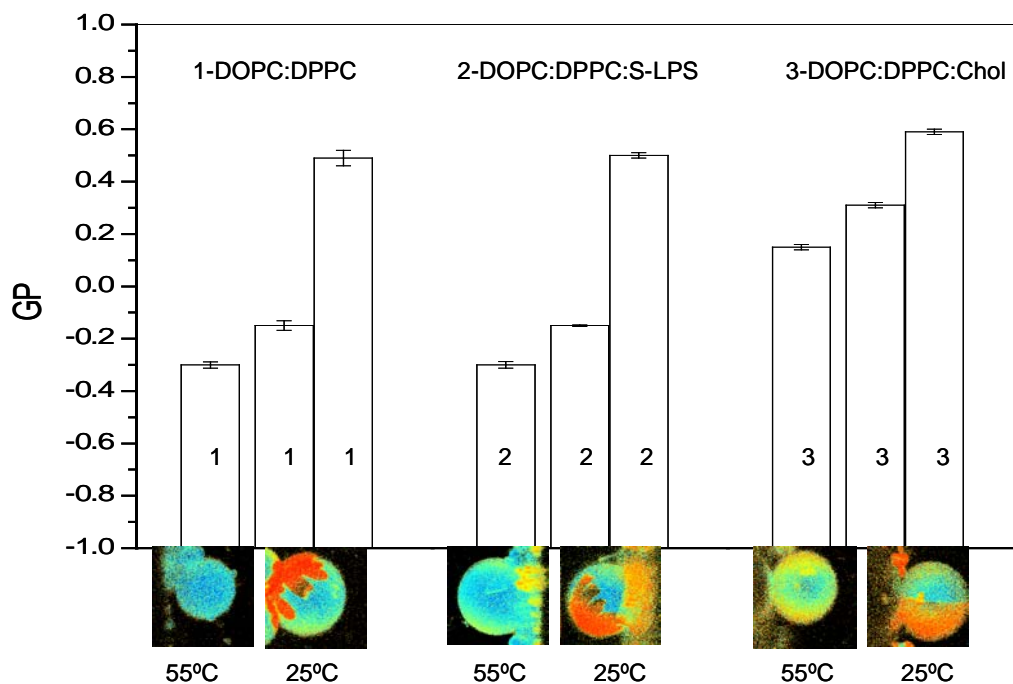


Figura IV.3C.2: Comparación del parámetro GP en bicapas compuestas por DOPC:DPPC como mezcla binaria y en presencia de LPS o colesterol. La comparación de las tres mezclas (1-DOPC:DPPC (1:1 mol:mol), 2- DOPC:DPPC:s-LPS y 3- DOPC:DPPC:Col (1:1:1 mol:mol:mol)) fue realizada a 55°C y 25°C. Los valores de GP se observan en la gráfica de barras y la forma de los dominios se muestra en las imágenes tomadas a la superficie de las GUVs.

La forma de los dominios de la mezcla que contiene LPS es similar a la forma de los dominios de la mezcla binaria y ambas son diferentes a lo observado en la mezcla que contiene colesterol.

Las medidas de GP del Laurdan muestran que la influencia del LPS y del colesterol en el empaquetamiento de los lípidos es diferente.

Como se mencionó anteriormente, las medidas de GP del Laurdan dan información sobre el empaquetamiento de los fosfolípidos en la bicapa basándose en el reacomodamiento de las moléculas de agua localizadas alrededor del dipolo de la sonda, localizado en la porción naftaleno (Parasassi, 1998). Los anillos planos de las moléculas

de colesterol interactúan con la porción hidrocarbonada de los fosfolípidos que están cercanos a la interfase acuosa (Sankaram, 1991) y en consecuencia afectan el dipolo del Laurdan (Parasassi, 1994). Como se mencionó anteriormente, la inserción del LPS en las bicapas por medio del lípido A, es equivalente a la inserción de glicoesfingolípidos. La fluorescencia del Laurdan en glicoesfingolípidos muestra un comportamiento particular debido a la estructura molecular e interfacial de dichos lípidos (Bagatolli, 1997): la cabeza polar confiere una interfase más hidratada con mayor área molecular que los fosfolípidos. La emisión del Laurdan puede verse afectada tanto por la polaridad del entorno de la sonda como por el estado de fase de la interfase.

Dentro de este escenario, se puede pensar que el Laurdan no reporta apropiadamente el efecto de la inserción del LPS en la bicapa y que el empaquetamiento de los dominios que contienen LPS o colesterol de hecho son similares. De todos modos, las imágenes de GP dan información extra acerca de las fases a través de la forma de los dominios. La misma está relacionada con el empaquetamiento de las fases coexistentes (Bagatolli, 2000) y el hecho de que los dominios en la mezcla que contiene LPS y aquellos en la mezcla binaria presenten forma de mano (diferente a la forma presente en los dominios en la mezcla que contiene colesterol) apoya la conclusión de que el empaquetamiento de dominios DPPC-LPS es diferente al empaquetamiento de dominios de DPPC-colesterol.

Todas las moléculas de LPS de las enterobacterias poseen una temperatura de transición de fase gel a líquido-cristalino en el rango de 30-37°C (Brandenburg, 1990). A 25°C las moléculas de LPS se encuentran en estado gel, más propensas a empaquetar con moléculas de DPPC (que también se encuentran por debajo de su T_t , 41°C (Koynova, 1998)) que con moléculas de DOPC en fase líquido cristalina (T_t -5°C (Koynova, 1998)).

Dentro de este contexto, en este trabajo de tesis se propone que el LPS de *E. coli* puede formar dominios en las membranas de células eucariotas y que dichos dominios pueden ser diferentes en naturaleza pero pueden jugar el mismo rol que los dominios que contienen colesterol, organizando un complejo de múltiples receptores involucrados en las vías de transducción de señales de la respuesta inmune, como fue propuesto para LPS de *B. abortus* (Forestier, 2000). La presencia de dominios de LPS en membranas de células eucariotas fue descrita para LPS derivado de la membrana externa de patógenos intracelulares. De todas formas, es posible que LPS proveniente de patógenos extracelulares en forma de vesículas de membrana externa (VMEs) o de fracciones de membrana, pueda incorporarse en membranas de células eucariotas a través de eventos de fusión y luego ocurra un *clustering* de componentes involucrados en la respuesta inmune innata.

IV.4- Bibliografía.

- Ahyayauch, H, Larijani, B, Alicia Alonso, A, *et al.* Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state: Influence of the acyl chain structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758 (2006), 190-196.
- Allende, D, McIntosh, T. Lipopolysaccharides in Bacterial Membranes Act like Cholesterol in Eukaryotic Plasma Membranes in Providing Protection against Melittin-Induced Bilayer Lysis. *Biochemistry*. 42 (2003), 1101-1108.
- Angelova, MI, Dimitrov, DS. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986), 303-311.
- Aurell, C, Wistrom, A. Critical aggregation concentrations of Gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253 (1998), 119-123.
- Bagatolli, LA, Gratton, E. Two-photon fluorescence microscopy observations of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 77 (1999), 2090-2101.
- Bagatolli, LA, Gratton, E. Two-photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophys. J.* 78 (2000), 290-305.
- Bagatolli, LA, Maggio, B, Aguilar, F, *et al.* Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures: a comparative fluorescence and calorimetric study. *Biochem. Biophys. Acta* 1325 (1997), 80-90.
- Bianco, I, Fidelio, G, Maggio, B. Effect of glycerol on the molecular properties of cerebroside, sulphatide and ganglioside in monolayers. *Biochem. J.* 251 (1988), 613-616.
- Brandenburg, K, Jurgens, G, Andra, J, *et al.* Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002), 5972-5981.
- Brandenburg, K, Seydel, U. Investigation into the fluidity of lipopolysaccharide and free lipid A membrane systems by Fourier-

transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Eur. J. Biochem.* 191 (1990), 229-236.

-Chong, P, Wong, P. Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. *Biochim Biophys Acta.* 1149 (1993), 260-266.

-de Haas, C, Poppelier, M, van Kessel, K, *et al.* Serum amyloid P component prevents high-density lipoprotein-mediated neutralization of lipopolysaccharide. *Infectious Immunology* 68 (2000), 4954-4960.

-Dietrich, C, Bagatolli, L, Volovyk, Z, *et al.* Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys. J.* 80 (2001), 1417-1428.

-Dijkstra, J, Mellors, J, Ryan, J. Altered in vivo activity of liposome-incorporated lipopolysaccharide and lipid A. *Infect Immun.* 57 (1989), 3357-3363.

-Dimitrov, DS, Angelo, MJ. Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 73 (1987), 48-56.

-Eid, JS, Muller, JD, Gratton, E. Data acquisition card for fluctuation correlation spectroscopy allowing full access to the detected photon sequence. *Rev. Sci. Instrum.* 71 (2000), 361-368.

-Forestier, C, Deleuil, F, Lapaque, N, *et al.* *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J. Immunol.* 165 (2000), 5202-5210.

-Forestier, C, Moreno, E, Meresse, S, *et al.* Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect. Immun.* 67 (1999), 4048-4054.

-Gennis, RB. *Biomembranes: Molecular Structure and Function.* Springer-Verlag, New York. (1989), 533.

-Gorvel, JP, Moreno, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90 (2002), 281-297.

-Gwozdziński, K, Pieniazek, A, Sudak, B, *et al.* Alterations in human red blood cell membrane properties induced by the lipopolysaccharide

from *Proteus mirabilis* S1959. *Chemico-Biological Interactions*. 146 (2003), 73-80.

-Imai, T, Fujita, T, Yamazaki, Y. Beneficial effects of Apolipoprotein A-I on endotoxemia. *Surgery Today* 33 (2003), 684-687.

-Johnston, A, Coppard, E, Parera, G, *et al.* Langmuir film balance study of the interactions between carbohydrates and phospholipid monolayers. *Biochemistry* 23 (1984), 6912-6919.

-Koyanova, R, Caffrey, M. Phases and phase transitions of the phosphocholines. *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998), 91-145.

-Kriegsmann, J, Gay, S, Brauer, R. Endocytosis of lipopolysaccharide in mouse macrophages. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* 39 (1993), 791-780.

-Ma, J, Liao, X, Lou, B, *et al.* Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Biochim. Biophys. Acta Sin (Shanghai)*. 36 (2004), 419-424.

-Maggio, B, Carrer, D, Fanani, M, *et al.* Interfacial behavior of glycosphingolipids and related sphingolipids. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2004), 448-458.

-McIntosh, TJ, Magid, AD, Simon, SA. Cholesterol modifies the short-range repulsive interactions between phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*. 28 (1989), 17-25.

-Montich, G, Bustos, M, Maggio, B, *et al.* Micropolarity of interfaces containing anionic and neutral glycosphingolipids as sensed by Merocyanine 540. *Chem. Phys. Lipids*. 38 (1985), 319-326.

-Mueller, M, Lindner, B, Kusumoto, S, *et al.* Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 26307-26313.

-Needham, D, Nunn, RS. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.* 58 (1990), 997-1009.

-Nichols, D, Olley, J, Garda, H, *et al.* Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000), 2422-2429.

- Parasassi, T, De Stasio, G, Ravagnan, G, *et al.* Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 60 (1991), 179-189.
- Parasassi, T, Di Stefano, M, Loiero, M, *et al.* Influence of Cholesterol on Phospholipid Bilayers Phase Domains as Detected by Laurdan Fluorescence. *Biophysical Journal.* 66 (1994), 120-132.
- Parasassi, T, Gratton, E. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *J. Fluorescence.* 8 (1995), 365-373.
- Parasassi, T, Gratton, E, Weiming, M, *et al.* Two-Photon Fluorescence Microscopy of Laurdan Generalized Polarization Domains in Model and Natural Membranes. *Biophysical Journal.* 72 (1997), 2413-2429.
- Parasassi, T, Krasnowska, EK, Bagatolli, LA, *et al.* Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *Journal of Fluorescence.* 8 (1998).
- Parasassi, T, Stasio, D, d'Ubaldo, A, *et al.* Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by LAURDAN fluorescence. *Biophys. J.* 57 (1990), 1179-1186.
- Parker, T, Levine, D, Chang, J, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infection and Immunity.* 63 (1995), 253-258.
- Poschl, J, Leray, C, Ruedf, P, *et al.* Endotoxin binding to erythrocyte membrane and erythrocyte deformability in human sepsis and *in vitro*. *Crit. Care Med.* 31 (2003), 924-928.
- Sanchez, S, Tricerri, MA, Gratton, E. Interaction of high density lipoprotein particles with membranes containing cholesterol *Journal of Lipid Research* 48 (2007), 1689-1700.
- Sanchez, SA, Bagatolli, LA, Gratton, E, *et al.* Two-photon view of an enzyme at work: *Crotalus atrox* venom PLA2 interaction with single-lipid and mixed-lipid giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 82 (2002), 2232-2243.

- Sankaram, MB, Thompson, TE. Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 8686-8690.
- Schroeder, RJ, London, E, Brown, DA. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994), 12130-12134.
- Schromm, A, Brandenburg, K, Loppnow, H, *et al.* Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), 2008-2013.
- Schromm, A, Brandenburg, K, Rietschel, E, *et al.* Do endotoxin aggregates intercalate into phospholipid membranes in a non-specific, hydrophobic manner? *J. Endotoxin Res.* 2 (1995), 313-323.
- Shauds, J, Chun, P. The dispersion of Gram negative lipopolysaccharide by deoxycolate. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 121-126.
- Snyder, S, Kim, D, McIntosh, T. Lipopolysaccharide bilayer structure: effect of chemotype, core mutations, divalent cations, and temperature. *Biochemistry.* 38 (1999), 10758-10767.
- So, PT, French, T, Yu, W, *et al.* Two photon fluorescence microscopy. *In Time-Resolved and Intensity Imaging in Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy.* John Wiley and Sons, New York (1996).
- So, PT, French, T, Yu, WM, *et al.* Time-resolved fluorescence microscopy using two-photon excitation. *Bioimaging.* 3 (1995), 49-63.
- Struck, D, Hoekstra, D, Pagano, R. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* 20 (1981), 4093-4099.
- Thieblemont, N, Wright, SD. Transport of bacterial lipopolysaccharide to the golgi apparatus. *J. Exp. Med.* 190 (1999), 523-534.
- Tricerri, M, Toledo, J, Sanchez, S, *et al.* Visualization and analysis of apolipoprotein A-I interaction with binary phospholipid bilayers. *J. Lipid Res.* 46 (2005), 669-678.

- Tristram-Nagle, S, Petrache, HI, Nagle, JF. Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* 75 (1998), 917-925.
- van Leeuwen, H, van Beek, A, Dalliga-Thie, G, *et al.* The role of high density lipoprotein in sepsis. *The Netherlands Journal of Medicine.* 59 (2001), 102-110.
- Veatch, SL, Polozov, IV, Gawrisch, K, *et al.* Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 86 (2004), 2910–2922.
- Warren, J. Stimulation of Na⁺ influx by endotoxic lipopolysaccharide and glycolipid. *FEMS Microbiol. Lett.* 17 (1982), 41-44.
- Weber, G, Farris, FJ. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 2-dimethylamino-6-propionyl-naphthalene. *Biochemistry.* 18 (1979), 3075-3078.
- Wistrom, C, Jones, G, Tobias, P, *et al.* Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of Lipopolysaccharide in Detergent Micelles. *Biophysical Journal* 70 (1996), 988-997.
- Wu, A, Hinds, C, Thiemermann, C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 21 (2004), 210-221.
- Wurfel, M, Wright, S. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers. *The Journal of immunology.* 158 (1997), 3925-3934.

Capítulo V: Interacción del LPS con apo AI.

Capítulo V: Interacción del LPS con apo AI.

V.1- Introducción.

Wu *et al.* (Wu, 2004) reportaron que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) poseen propiedades antiinflamatorias y juegan un rol crucial en la inmunidad innata, regulando la respuesta inflamatoria y disminuyendo la severidad del daño tisular durante el shock séptico, vía unión y neutralización del LPS.

El mecanismo por el cual las HDL median la respuesta anti-endotoxina aún no está claro. Varios estudios indican que la función anti-LPS de las HDL se debe a la interacción entre la región lípido A del LPS y los fosfolípidos de las HDL (Parker, 1995), (Levine, 1993) mientras que otros autores apoyan la teoría de que la apo AI es el factor principal en la neutralización mediada por HDL (Massamiri, 1997), (Park, 1996).

La apo AI es el componente proteico principal de las HDL plasmáticas. La alta flexibilidad conformacional que posee la apo AI es necesaria para su existencia en diferentes estados: libre de lípidos, pobre en lípidos y presente en lipoproteínas discoidales o esféricas de diferente tamaño. La proteína madura contiene 243 residuos de aminoácidos con repeticiones homólogas de 11 y 22 residuos que predicen la formación de α -hélices anfipáticas (Brewer, 1978) las cuales pueden interactuar con lípidos a través de su cara hidrofóbica. Las hélices están unidas por regiones cortas y flexibles con estructura giro- β que contienen residuos de prolina.

Se cree que la estructura de la apo AI libre de lípidos se asemeja a un ramillete de hélices (Davidson, 1999) en un estado tipo glóbulo fundido, soportando una estructura flexible (Gursky, 1996). En las α -HDL esféricas, se ha propuesto que las hélices anfipáticas se encuentran orientadas en paralelo a la superficie de la monocapa de fosfolípidos con las caras hidrofóbicas embebidas en la región hidrocarbonada y

con las caras hidrofílicas interactuando con las cabezas polares de los fosfolípidos y con el medio acuoso (Segrest, 1992). Es aceptado que las lipoproteínas discoidales están compuestas por un disco de bicapa lipídica con la apo AI bordeando por fuera, pero la orientación de las hélices respecto a las cadenas acilo es controversial. De todos modos, la evidencia experimental sostiene el modelo del cinturón, que propone que la apo AI se envuelve alrededor del borde del disco con el eje de las α -hélices orientado perpendicularmente a las cadenas acilo (Huihua, 2000). La flexibilidad conformacional de la apo AI puede también jugar un rol en la interacción y el intercambio lipídico de las HDL con membranas.

Se han propuesto tres dominios en la apo AI: dominio N-terminal (residuos 1-99), dominio central (aa 99-142 ó 99-186) y dominio C-terminal (aa 143-243 ó 187-243). La porción central no está bien definida, en parte debido a la función independiente de las hélices 6 y 7 que involucran los residuos 143-186 (Sorci-Thomas, 2000).

La porción N-terminal de la apo AI es altamente α -helicoidal (Davidson, 1999) (Zhu, 2004), tiene poca afinidad por lípidos y es la región responsable de la estabilidad de la proteína en solución (Rogers, 1998). La región central es un dominio flexible (Marcel, 1991), contiene hélices del tipo Y que poseen menor afinidad por lípidos (Segrest, 1992) y es responsable de la activación de la enzima LCAT (Sorci-Thomas, 2002), mientras que la porción C-terminal posee alta afinidad por lípidos, es relativamente inestable, se encuentra desorganizada cuando la proteína está en solución y aumenta su contenido α -helicoidal luego de la unión a lípidos (Davidson, 1996).

Cuando la apo AI se encuentra en contacto con lípidos en partículas de HDL reconstituidas (rHDL), la región N-terminal experimenta un reacomodamiento de sus segmentos α -helicoidales sin mayores cambios en la composición helicoidal global. En cambio, la porción C-terminal se torna altamente helicoidal y se convierte en el principal

dominio estabilizador. Este modelo fue ampliado por Roberts *et al.* (Roberts, 1997) quien estudió la apo AI libre de lípidos por métodos de proteólisis limitada, encontrando que la porción C-terminal de la apo AI libre de lípidos (en su caso, aa 190-243) es altamente susceptible a la proteólisis, mientras que el extremo N-terminal se encuentra menos expuesto. Un análisis de los fragmentos de proteólisis generó un modelo de la apo AI libre de lípidos que consiste en un manojito de α -hélices en la región N-terminal con un extremo C-terminal desorganizado. La noción de una porción N-terminal organizada en un manojito de hélices es apoyada por estudios realizados para la apo AI de pollo (Kiss, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la apo AI posee estructura de α -hélice anfipática y es posible que los sitios de unión a lípidos en las hélices anfipáticas sean los dominios de unión a la porción lípido A del LPS, pudiendo tras la unión, neutralizar la toxicidad del mismo. De esta forma, la apo AI podría ser utilizada como un tratamiento efectivo para prevenir y revertir las consecuencias de la endotoxemia.

Al momento, algunos autores reportaron que la apo AI inactiva directamente la endotoxina, como fue demostrado en estudios *in vitro* por Emancipator *et al* (Emancipator, 1992). Más recientemente, Yan *et al* (Yan, 2006) demostró que la apo AI puede: atenuar la inflamación y el daño pulmonar agudo inducido por LPS; inhibir significativamente los niveles de citoquinas inflamatorias en suero liberadas en respuesta a la presencia de la toxina, inhibir la muerte de células L-929 inducida por macrófagos activados por LPS de forma dosis-dependiente y disminuir significativamente la mortalidad en ratones con endotoxemia.

Los estudios realizados por Ma *et al* (Ma, 2004) demostraron por primera vez que la apo AI purificada por ultracentrifugación une e inactiva el LPS sin la necesidad de la LBP. Estos resultados implican que hay al menos dos tipos de sitios de unión al LPS: uno es posiblemente el dominio de unión a lípidos de las regiones hidrofóbicas de las α -hélices anfipáticas de la apo AI por medio de las cuales la apo AI une el LPS

directamente; otro es el sitio de unión a la LBP por el cual la apo AI une LPS indirectamente. Massamiri *et al.* (Massamiri, 1997) reportó que al menos tres regiones de la apo AI, localizadas entre los residuos de aa 1-31, 95-164 y 178-200, participan en la asociación directa o indirecta entre LBP-HDL, pero la región de la apo AI involucrada en la interacción directa con el LPS no ha sido descrita hasta ahora.

El entendimiento del proceso de neutralización del LPS mediado por apo AI requiere conocimientos sobre la conformación de apo AI libre de lípidos y las transiciones moleculares que ocurren en la proteína al unir LPS. En este capítulo de tesis se realizaron estudios estructurales de la apo AI libre e incubada con LPS, se verificó la interacción de ambas moléculas por ensayos de *cross-linking* y se identificó la porción de apo AI involucrada en la interacción directa con el LPS.

V.2- Materiales y métodos.

V.2.1- Materiales.

N-bromosuccinimida (NBS), ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS), Cloruro de Guanidinio (GndHCl), tripsina, LPS *E.coli* 0111:B4, borato (Sigma), Sulfosuccinimidyl 2-(p-azidosalicylamido)-1,3'-dithiopropionate (SASD, G-Biosciences), Hepes, EDTA, Na¹²⁵I (NEN Perkin Elmer), Cloramina-T, meta-bisulfito de Sodio, CNBr, Tricina (Bio-Rad), membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF).

La apo AI fue obtenida por el método de purificación descrito en Materiales y Métodos generales (Tricerri, 1998).

V.2.2- Modificación química de los residuos Triptofano de la apo AI con N-bromosuccinimida (NBS).

En este trabajo de tesis, la sonda NBS (Figura V.1) fue utilizada para oxidar los residuos triptofano (Trp) de la apo AI con la finalidad de determinar la participación de dichos residuos en la interacción con el LPS.

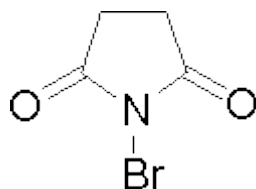


Figura V.1: Estructura de la N-bromo succinimida.

Se incubó apo AI (2.85 μ M) y apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol) (preincubados a 25°C por 15 minutos) con NBS. La solución de NBS fue preparada en el momento y se agregó a la apo AI o apo AI-LPS en buffer A, en relación molar NBS:Trp en el rango desde 0.25:1 a 2:1 (mol:mol) (Ohnishi, 1980). Luego de equilibrar las mezclas por 10 minutos, se colectó el espectro de emisión de fluorescencia del Trp (300-400 nm).

Las medidas de fluorescencia fueron corregidas por el factor de dilución.

V.2.3- Fluorescencia del 8-anilino-1-naftalensulfonato (ANS).

Espectros de emisión y ensayos de FRET.

El ANS (Figura V.2) ha sido ampliamente utilizado como sonda fluorescente extrínseca para monitorear superficies hidrofóbicas en macromoléculas como las proteínas y membranas. La sonda posee un máximo de emisión a 545 nm con una baja fluorescencia cuando se encuentra libre en solución acuosa. La intensidad de fluorescencia del ANS aumenta cuando la sonda se disuelve en solventes no polares o cuando se une a macromoléculas biológicas. Se considera que la disminución en la polaridad del entorno de la sonda es el principal factor que contribuye al incremento en la fluorescencia observado cuando el ANS se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, observando un corrimiento del máximo en el espectro de emisión (470 nm) (Stryer, 1968).

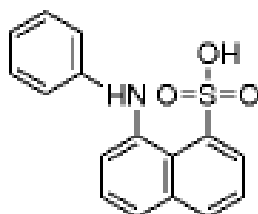


Figura V.2: Estructura del ANS.

El espectro de emisión de fluorescencia del ANS fue medido en buffer A y en presencia de apo AI (2.85 μ M) o apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol). La fluorescencia del ANS en buffer es despreciable (Stryer, 1965). Se realizó una titulación de apo AI y apo AI-LPS con concentraciones crecientes de ANS (0-100 μ M). Las muestras fueron excitadas a 395 nm y la emisión fue colectada en el rango de 400-600 nm.

Los experimentos de FRET entre el ANS y los residuos Trp de la apo AI fueron realizados con la finalidad de analizar si la presencia del LPS promueve algún cambio en la conformación de la apo AI que modifique la exposición de los residuos Trp en la superficie de la proteína.

Para estos experimentos, se incubó apo AI (2.85 μM) o apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol) con diferentes concentraciones de ANS (0-100 μM). Las muestras fueron excitadas a 295 nm para excitar selectivamente los residuos Trp y se midió la emisión de fluorescencia entre 300-500 nm. La eficiencia de FRET se calculó a partir de la disminución de fluorescencia del donador (Long-Sen, 1994).

$$\text{Eficiencia de FRET (\%)} = \{(F_0 - F)/F_0\} \times 100. \quad (\text{Ec.V.1})$$

donde F_0 y F corresponden a la intensidad de fluorescencia del Trp en ausencia y en presencia de ANS, respectivamente. F_0 corresponde al 100% de fluorescencia del Trp.

V.2.4- Desnaturalización de la apo AI y apo AI-LPS con Cloruro de Guanidinio (GndHCl).

La emisión de fluorescencia de los Trp fue utilizada para monitorear el proceso de desnaturalización de la apo AI a concentraciones crecientes de GndHCl, en presencia y ausencia de LPS.

La estabilidad química de la proteína fue medida luego de incubar apo AI (2.85 μM) o apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol, preincubados por 15 minutos), con diferentes concentraciones de GndHCl (0-5.5 M) en buffer A por 2 hs a 25°C. Luego de la incubación con GndHCl, se midieron los espectros de emisión de fluorescencia del Trp (320-400nm). La intensidad de fluorescencia a 333 nm fue utilizada para calcular la

fracción molar de moléculas desnaturalizadas (f_D) (Pace, 1986), utilizando la siguiente ecuación:

$$f_D = \frac{X_x - X_{\text{GdnHCl } 0\text{M}}}{X_{\text{GdnHCl } 5.5\text{M}} - X_{\text{GdnHCl } 0\text{M}}} \quad (\text{Ec. V.2})$$

donde X_x es la intensidad de fluorescencia a 333 nm para cada concentración de GndHCl testeada.

V.2.5- Proteólisis limitada.

Se realizaron experimentos de proteólisis limitada con Tripsina, con el objetivo de analizar si el acceso a los sitios de clivaje sobre la proteína se modifican como consecuencia de la interacción con LPS. La Tripsina es una enzima proteolítica que cliva péptidos en el extremo C-terminal de residuos de lisina y arginina.

En los experimentos realizados, se incubó apo AI y apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol, previamente incubado a 25°C por 15 minutos) con tripsina en relación 200:1 proteína:tripsina (p/p). El experimento de proteólisis se realizó en buffer A, pH 7.4 y 25°C en baño con agitación. Se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo (entre 0-80 minutos). Se frenó la reacción por adición de PMSF 0.1mM y los productos de digestión se analizaron por SDS-PAGE 17% y por *western blott* utilizando diluciones 1/1000 para el anticuerpo anti-apo AI obtenido en conejo y 1/3000 para el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo obtenido en cabra conjugado con peroxidasa. La intensidad de las bandas principales fue analizada utilizando el *software* Kodak Digital Science 1D.

V.2.6- Dicroísmo Circular.

Para el análisis de cambios en la estructura de la apo AI como consecuencia de la interacción con el LPS se realizaron ensayos de dicroísmo circular.

Las muestras de apo Al y apo Al-LPS (1:2.8 mol:mol, previamente incubado a 25°C por 15 minutos) fueron disueltas en buffer 50 mM fosfato de sodio, 100 mM NaCl pH 7. La concentración de proteína utilizada fue 0.1mg/ml.

Los espectros de dicroísmo circular (CD) en la región lejana del espectro (195-250 nm) fueron colectados utilizando cubetas de 1 mm de paso, en un espectropolarímetro Jasco J-810. Las medidas se realizaron a 25°C con una velocidad de escaneo de 20 nm/min utilizando una constante de tiempo de 1seg.

Cada espectro fue medido 3 veces y los datos fueron promediados para reducir el ruido de los espectros.

La elipticidad molar (θ) fue calculada a partir de la ecuación:

$$[\theta] = (\theta) \times (100 \times \text{MRW} / l \times c) \quad (\text{Ec V.3})$$

donde θ es la elipticidad molar (millidegrees), MRW es el peso molecular promedio de un residuo de aminoácido (g/mol, el valor utilizado para apo Al fue 114.45 (Schmid, 1989)), l es el ancho del paso de la luz (cm) y c es la concentración de proteínas (mg/ml). El valor de $[\theta]$ tiene las unidades $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.

El cálculo del contenido de α -hélice se realizó basado en la ecuación:

$$f_h = -([\theta]_{222} + 2340) / (-30300) \quad (\text{Chen, 1972}) \quad (\text{Ec V.4})$$

V.2.7- Síntesis de ASD-LPS.

EL sulfosuccinimidil 2-(p-azidosalicilamido)-1,3'-ditiopropionato (SASD) (Figura V.3) es un reactivo de entrecruzamiento fotoactivable-iodinable que transfiere marca radiactiva de una molécula a otra. Al exponerlo a la luz ultravioleta (UV) el SASD se vuelve activo y se une de forma no específica a moléculas vecinas.

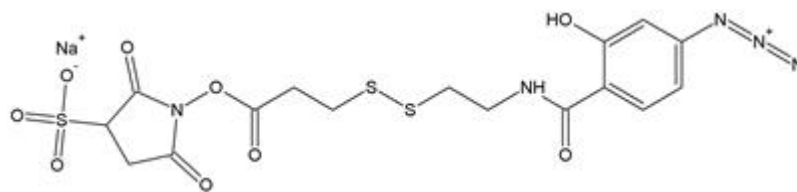


Figura V.3: Estructura del SASD.

La síntesis del derivado fotoactivable de LPS (ASD-LPS) fue realizada según el protocolo descrito por Wollenweber y Morrison (Wollenweber, 1985), con algunas modificaciones. Para el procedimiento de derivatización de LPS con el reactivo iodizable y fotoactivable SASD, se mezcló LPS de *E.coli* 0111:B4 (2mg/ml) en 5mM EDTA pH 7.4 (1.5 ml) con borato 0.1M pH 8.5 (1.5 ml). Luego se agregaron 6 mg de sulfosuccinimidil 2-(p-azidosalicilamido)-1,3'-ditiopropionato (SASD), la solución fue sonicada en un sonicador Ultrasonic modelo W-375 y luego la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se realizó una nueva incubación con 6 mg de SASD, tal cual fue descrito anteriormente. Para separar el remanente de SASD, la preparación de LPS acoplado al 2-(p-azidosalicilamido)-1,3'-ditiopropionato (ASD-LPS) fue centrifugada a 2000 x g, por 2 minutos. El sobrenadante fue dializado contra buffer Hepes 50mM, EDTA 5mM, pH 7.4 a 4°C (6 cambios de buffer). Luego se alicuotó (250 µl) y se almacenó a -20°C.

Todas las reacciones donde se utilizó compuesto fotosensible se llevaron a cabo al cuidado de la luz.

V.2.8- Marcado del ASD-LPS con ¹²⁵I.

La iodación del ASD-LPS (250 µl) se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Ulevitch (Ulevitch, 1978) con pequeñas modificaciones. Se agregó Na¹²⁵I (5 mCi, en 14 µl de NaOH 0.1 mM) al ASD-LPS en 50 µl de Cloramina-T (0.1mg/ml, en 5mM EDTA pH 7.4), preparada en el momento de su utilización. Se lo incubó por 5 minutos a temperatura

ambiente. La reacción se frenó con 50 μ l de meta-bisulfito de sodio (0.1 mg/ml en 5 mM EDTA, pH 7.4), preparada en el momento de su utilización. La mezcla de reacción fue dializada contra buffer Hepes 50 mM, 5 mM EDTA, pH 7.4 a 4°C.

Se colectó la muestra de 125 I-ASD-LPS, se realizó ensayo de KDO para la cuantificación del LPS y chequeo de cpm para cuantificar radiactividad. La relación 125 I-LPS obtenida fue 3 μ Ci/ μ g LPS.

Luego del proceso de derivatización-iodinación (Figura V.4), obtenemos 125 I-ASD-LPS, que al incubarlo con apo AI y fotoactivar, si las moléculas se encuentran lo suficientemente cerca se entrecruzarán y se observará marca radiactiva unida a la apo AI.

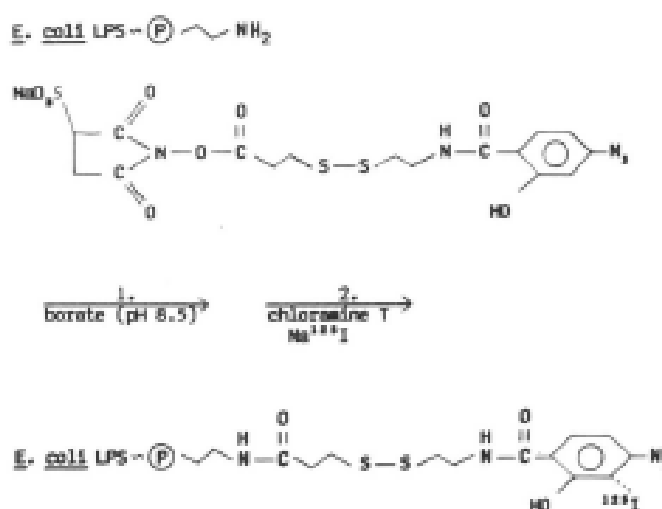


Figura V.4: Proceso de obtención de 125 I-ASD-LPS.

V.2.9- Ensayos de *cross-linking* con 125 I-ASD-LPS.

Con la finalidad de observar por marca radiactiva la interacción apo AI-LPS, se realizaron ensayos de *cross-linking* entre la proteína y 125 I-ASD-LPS.

Se incubó 125 I-ASD-LPS (5 μ l, que contienen aproximadamente 5 μ g de LPS) con apo AI, por 1 hora a 25°C en tubos de vidrio. Las muestras se sometieron a fotólisis por irradiación con luz UV de onda corta proveniente de una lámpara de Xenón (450 watts) a una

distancia de 25 cm. Se agregó buffer muestra para geles SDS en presencia y ausencia del agente reductor β -mercaptoetanol.

Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE 4-25%. Se sembró igual cantidad de radiactividad en cada muestra. La visualización de proteínas se realizó por tinción con Coomassie Blue. Luego se analizó la presencia de marca radiactiva en las muestras, por autorradiografía, exponiendo los geles en un scanner modelo Storm 840. Los geles fueron previamente sometidos a proceso de secado en un Slab Gel Dryer (Bio-Rad).

V.2.10- Proteólisis de apo AI con CNBr.

Con el fin de identificar que región de la proteína interactúa con el LPS, se realizaron ensayos de proteólisis sobre muestras de apo AI y apo AI- ^{125}I -ASD-LPS (1:2.8 mol:mol), para determinar por la presencia de radiactividad, que segmento de la apo AI se une al LPS.

Para el clivaje con CNBr, las muestras (apo AI o apo AI- ^{125}I -ASD-LPS) se solubilizaron en 50 μl de ácido fórmico 70%. Se agregó CNBr en relación 30:1 p/p (CNBr:apo AI) y se dejó incubando bajo atmósfera de N_2 , a temperatura ambiente por 24 horas. Luego las muestras fueron llevadas a seco utilizando un speed-Vac y se re-disolvieron en buffer muestra para su análisis en SDS-PAGE utilizando sistema de geles Tris-Tricina. La electroforesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Schägger *et al* (Schägger, 1987) en geles Tris-Tricina 17% acrilamida. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se fijaron por 30 minutos en una solución metanol:acético (50:10 v/v) y posteriormente se visualizaron las bandas de proteólisis por tinción con Coomassie (0.025% Coomassie Blue R250 en 10% ácido acético). Los geles (previamente decolorados y sometidos al proceso de secado) fueron autorradiografiados por exposición en X-Omat film (Kodak) por diferentes períodos de tiempo, dependiendo de la cantidad de radiactividad.

V.2.11- Secuenciamiento de los fragmentos de apo AI que unen LPS.

Para identificar las secuencia de los fragmentos de apo AI capaces de unir LPS se realizó secuenciamiento de la bandas proteolíticas de menor peso molecular que tienen marca radiactiva.

Los fragmentos de proteólisis de apo AI-ASD-LPS fueron transferidos desde los geles 17% acrilamida en sistemas Tris-Tricina a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), utilizando equipo de transferencia (Bio-Rad) a 100 V por 40 minutos. Una vez finalizada la transferencia las membranas fueron teñidas con Coomassie para visualizar las bandas. El secuenciamiento N-terminal se realizó a partir de las bandas transferidas a la membrana de PVDF por el método de Edman, utilizando un secuenciador modelo 477 (Applied Biosystems), en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LaNalS-Pro, Universidad de Buenos Aires-CONICET).

V.3- Resultados y Discusión.

V.3.1- Modificación química de los residuos Trp de apo AI con N-bromosuccinimida (NBS).

Para determinar la participación de la región N-terminal de la proteína, donde se encuentran los 4 residuos Trp de la misma, en la interacción con LPS, se sometió a la apo AI (libre y en presencia de LPS) al proceso de oxidación con N-bromosuccinimida (NBS). Los experimentos fueron realizados en condiciones neutras para aumentar la especificidad por los residuos Trp. Bajo estas condiciones, la reacción del NBS con los Trp de la apo AI se completa dentro de los 10 minutos de incubación.

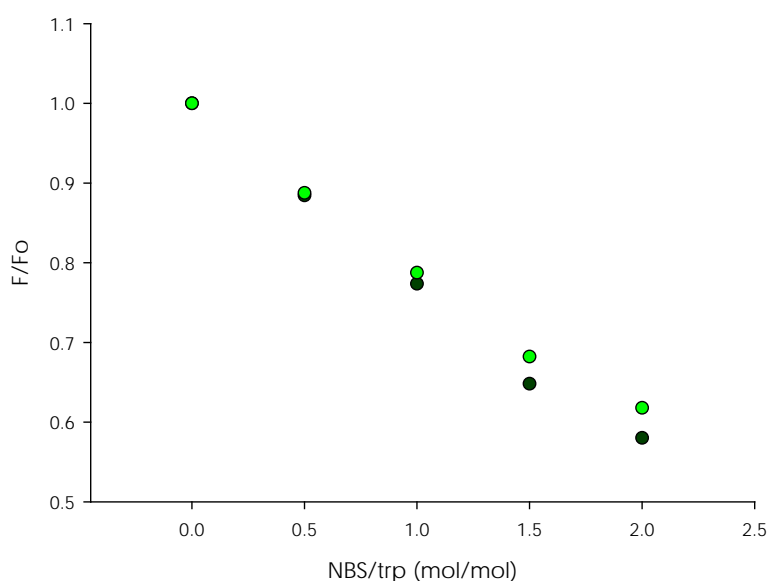


Figura V.5: Modificación química de los residuos Trp de apo AI con N-bromosuccinimida (NBS). Se midió la fluorescencia intrínseca de la apo AI (●) (2.85 μ M) y apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol) (●) luego del agregado de NBS (relación molar NBS:Trp en el rango desde 0.25:1 a 2:1 (mol:mol)). F_0 y F representan la fluorescencia intrínseca de la proteína nativa y oxidada, respectivamente.

Como se muestra en la Figura V.5, la fluorescencia disminuye aproximadamente en un 50% en ambas muestras (apo AI libre y apo AI-LPS). Este resultado indica que en ambas condiciones algunos de los residuos Trp se encuentran protegidos de la exposición al solvente y que la interacción con el LPS no modifica el patrón de oxidación, por ende no modifica la exposición de residuos Trp, sugiriendo que el extremo N-terminal (Nt) de la apo AI, donde están localizados los residuos Trp, no está involucrado en la interacción con el LPS.

V.3.2- Experimentos de unión de ANS.

Con el objetivo de determinar el efecto de la interacción del LPS sobre la organización molecular de la apo AI libre de lípidos, se determinaron las propiedades de fluorescencia de la sonda 8-anilino-1-naftalensulfonato (ANS).

El ANS es una sonda cuya fluorescencia intrínseca aumenta por la unión a una superficie o cavidad hidrofóbica (Stryer, 1965). En los experimentos desarrollados se analizó la fluorescencia del ANS en muestras de apo AI y apo AI-LPS con el fin de determinar si la interacción del LPS con la proteína, expone regiones hidrofóbicas accesibles a la sonda que nos permitan determinar diferencias conformacionales entre la apo AI libre y unida al LPS.

En ausencia de apo AI, el ANS tiene muy baja emisión de fluorescencia, con una longitud de onda máxima de emisión centrada en 515 nm ($\lambda_{exc} = 395\text{nm}$). Al agregar apo AI se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia de la sonda (Figura V.6A). La presencia de LPS promueve el mismo efecto, la intensidad de fluorescencia de la sonda aumenta en presencia de apo AI-LPS, pero la intensidad de emisión de fluorescencia es mucho mayor, respecto a la apo AI libre (Figura V.6B). Estos resultados demuestran que la interacción de la proteína con LPS promueve un incremento en la superficie hidrofóbica accesible al ANS.

El LPS no modifica la fluorescencia del ANS, por lo tanto el aumento de unión de sonda a la proteína se debe a un cambio de conformación de la apo AI, inducida por el LPS.

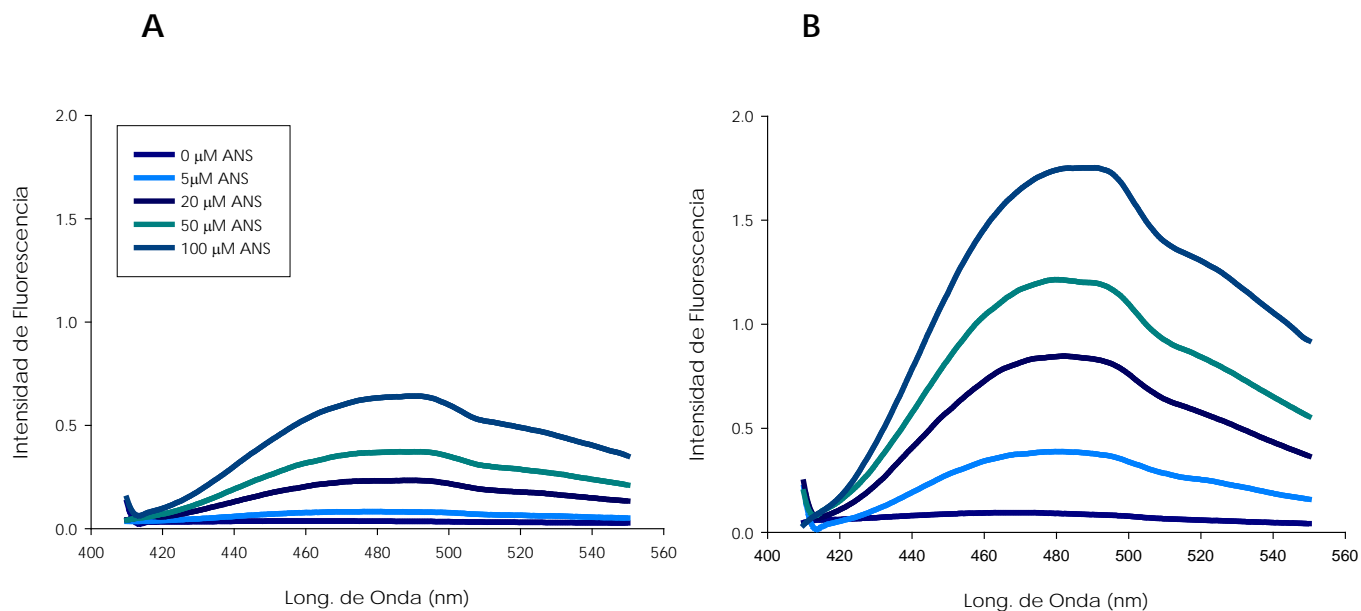


Figura V.6: Ensayos de unión de ANS.

Los espectros de emisión de fluorescencia del ANS fueron tomados en presencia de apo AI (panel A) y apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol)(panel B). Los espectros fueron medidos a concentraciones crecientes de ANS (0-100 μM). Las muestras fueron excitadas a 395 nm. La concentración de apo AI utilizada fue 2.85 μM.

Los ensayos de FRET fueron realizados con el objetivo de determinar si la interacción apo AI-LPS modifica la exposición de residuos Trp de la proteína, accesibles al ANS. La emisión de fluorescencia de los residuos Trp disminuye con el agregado de concentraciones crecientes de ANS, debido a la transferencia de energía desde los Trp de la apo AI hacia las moléculas de sonda unidas a la proteína, con el consiguiente aumento en la eficiencia de FRET.

La eficiencia de transferencia de energía, calculada a partir de la disminución de fluorescencia del donador, fue similar para ambas muestras (apo AI y apo AI-LPS), apoyando la hipótesis de que el LPS no interactúa con el extremo N-terminal de la apo AI, donde se encuentran localizados los residuos Trp (Figura V.7).

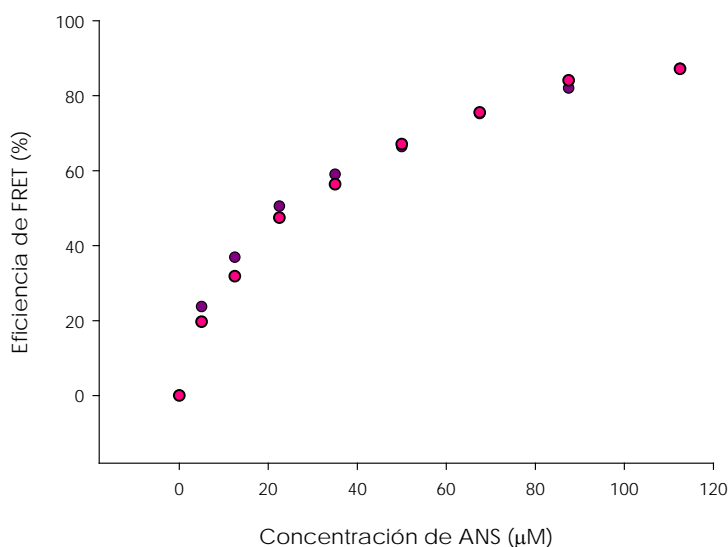


Figura V.7: Ensayos de FRET entre moléculas de ANS y residuos Trp para apo AI (●) y apo AI-LPS (1:2.8 mol:mol) (●).

La eficiencia de FRET (%) fue calculada a partir de la ecuación V.1: $\{(F_0 - F)/F_0\} \times 100$, donde F_0 y F corresponden a la intensidad de fluorescencia del Trp en ausencia y en presencia de ANS, respectivamente.

V.3.3- Ensayos de desnaturalización de apo AI y apo AI-LPS con GndHCl.

Las curvas de desnaturalización son utilizadas para medir diferencias en la estabilidad conformacional de las proteínas. La concentración relativa de conformación plegada (nativa) y conformación desplegada puede determinarse a partir del seguimiento de las propiedades espectrales de sondas como el Trp, que son

utilizadas para monitorear el estado conformacional de las proteínas (Pace, 1986). La intensidad de fluorescencia del Trp a 333 nm, que corresponde a su λ_{max} , disminuye durante el proceso de desnaturalización por exposición al medio acuoso. Utilizando el valor de intensidad de fluorescencia a 333 nm para cada concentración de GndHCl es posible estimar la fracción molar de moléculas desnaturalizadas (f_D) (Figura V.8).

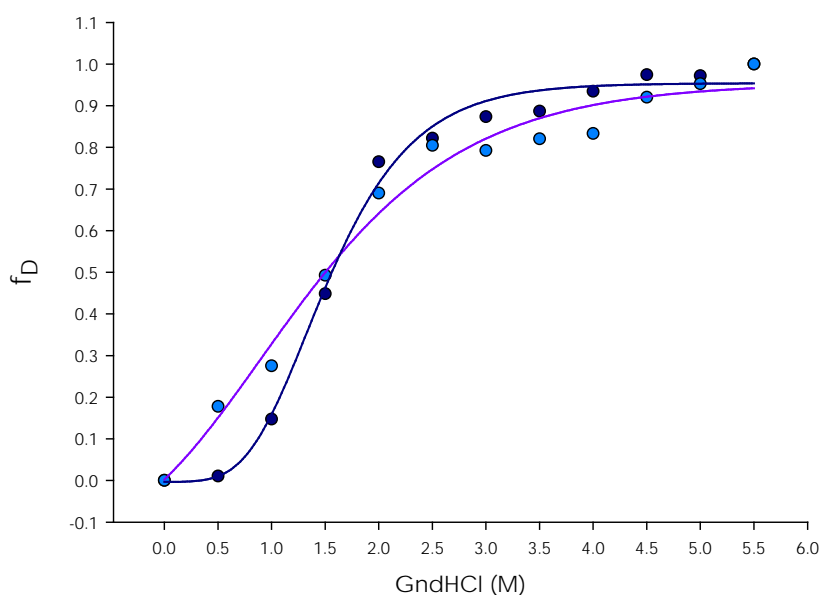


Figura V.8: Curvas de desnaturalización de apo AI (●) y apo AI-LPS (●) a diferentes concentraciones de GdnHCl (0-5.5 M) en buffer A pH 7.4 25°C. La desnaturalización se cuantificó por I_f a 333 nm (X), la fracción molar de moléculas desnaturalizadas (f_D) se calculó a partir de la ecuación V.2. La longitud de onda de excitación fue 295 nm. La concentración de proteína utilizada fue 2.85 μ M y la relación apo AI-LPS 1:2.8 (mol:mol). Los datos se ajustaron a curvas sigmoideas utilizando el programa Sigma Plot. Las líneas azul y celeste corresponden a las curvas de desnaturalización para apo AI y apo AI-LPS, respectivamente.

Para calcular los valores de f_D se utilizó la siguiente ecuación:

$$f_D = (X_x - X_{\text{GdnHCl } 0 \text{ M}}) / (X_{\text{GdnHCl } 6 \text{ M}} - X_{\text{GdnHCl } 0 \text{ M}}) \quad (\text{Ec. V.2})$$

donde X_x es la intensidad de fluorescencia a 333 nm para cada concentración de GdnHCl utilizada.

El proceso de desplegamiento por acción del GdnHCl alcanza una meseta y los datos experimentales se ajustan a un modelo de dos estados. La concentración de GdnHCl necesaria para alcanzar el punto medio de la transición de los dos estados (C_m) es de 1.4 para ambas muestras, apo Al y apo Al-LPS.

Las curvas de desnaturalización dan información relevante respecto a la estabilidad de la apo Al libre o asociada al LPS, como puede observarse en la Figura V.8, la presencia de LPS en la muestra disminuye la cooperatividad del proceso de desnaturalización.

Como el desplegamiento consiste en un proceso en equilibrio que involucra dos estados, nos permite definir una constante de equilibrio $K = f_D / (1 - f_D)$. La energía libre de Gibbs ($\Delta G^\circ = -RT \ln K$) para la reacción de desnaturalización puede calcularse en términos de la fracción molar a una concentración de GdnHCl en particular. La dependencia de ΔG° con la concentración de GdnHCl puede aproximarse a la ecuación lineal $\Delta G^\circ = \Delta G^\circ_{\text{H}_2\text{O}} - m [\text{GdnHCl}]$ donde la energía libre del desplegamiento en ausencia de desnaturalizante ($\Delta G^\circ_{\text{H}_2\text{O}}$), que representa la estabilidad conformacional de la proteína, puede obtenerse extrapolando a cero la concentración de desnaturalizante. El coeficiente m es proporcional a la cantidad de regiones hidrofóbicas de la proteína que son expuestas al solvente cuando la proteína se despliega (Myers, 1995). El valor de C_m , concentración de GdnHCl en el punto medio de la desnaturalización, puede obtenerse cuando $\Delta G = 0$. Como se mencionó anteriormente, el valor de C_m no se modifica en presencia de LPS.

A partir de la Figura V.9, puede observarse que los valores de $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ y m cambian en presencia de LPS. El $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ disminuye de 3544 cal/mol a 1426 cal/mol, y el valor de m disminuye de 2207 a 937 (valores para apo Al y apo Al-LPS, respectivamente).

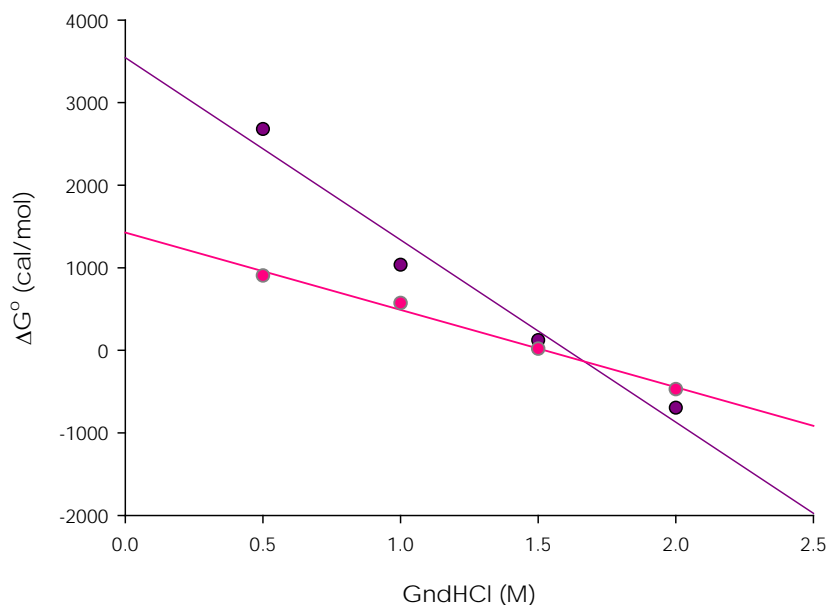


Figura V.9: Dependencia de energía libre de desnaturalización (ΔG°) con la concentración de desnaturalizante para apo Al(●) y para apo Al/LPS (●). Los valores de m y $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ fueron calculados a partir de la pendiente y la intersección con el eje de las ordenadas, respectivamente.

Las proteínas con conformación tipo glóbulo fundido se despliegan a bajas concentraciones de desnaturalizante y no poseen curvas de desnaturalización de forma sigmoidea, indicando falta de cooperatividad en el proceso de desplegamiento. Ha sido propuesto que la apo Al se despliega y una lípidos vía un estado glóbulo fundido (Gursky, 1996). A partir de los ensayos de desnaturalización realizados en este trabajo de tesis, encontramos que el complejo apo Al-LPS tiene un comportamiento correspondiente a un estado del tipo glóbulo fundido.

Como consecuencia de la interacción con el LPS, la apo AI es menos estable, demostrado por un menor valor de $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$. En presencia de LPS el proceso de desnaturalización es más favorable termodinámicamente. El valor de ΔG° , en presencia de LPS, disminuye más lentamente al aumentar la concentración de desnaturalizante, como era esperado por el menor incremento en la exposición de regiones hidrofóbicas durante el proceso de desnaturalización en concordancia con una estructura más relajada del complejo apo AI-LPS y reflejado también en un menor valor de m en comparación con la apo AI.

V.3.4- Proteólisis Limitada.

La proteólisis limitada fue utilizada para estudiar posibles cambios en la estructura de la apo AI inducidos por su interacción con el LPS, que como consecuencia expongan regiones de la apo AI accesibles al clivaje por Tripsina.

Los productos de digestión proteolítica fueron separados por SDS-PAGE y luego los gels fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa por la técnica de *western Blott*, para mayor sensibilidad en la detección de las bandas proteolíticas.

Como puede observarse en la figura V.10 panel A, la apo AI es digerida casi por completo por la tripsina en los 80 minutos de exposición con la subsiguiente aparición de 4 fragmentos mayoritarios de menor peso molecular (designados como a, b, c y d). La banda a, descrita por otros autores (Ji, 1995) como un intermediario estable de 22 kDa correspondiente a la porción N-Terminal de la apo AI, aparece inmediatamente de comenzada la digestión y permanece como uno de los productos a lo largo de todo el proceso, aunque a diferencia de lo descrito por Ji *et al* (Ji, 1995), este intermediario no se acumula a lo largo de la proteólisis. En nuestros experimentos de digestión aparecen otras bandas no descritas, correspondientes a los fragmentos b, c y d,

que aumentan en intensidad a lo largo de la digestión, transformándose las bandas b y c en los fragmentos mayoritarios.

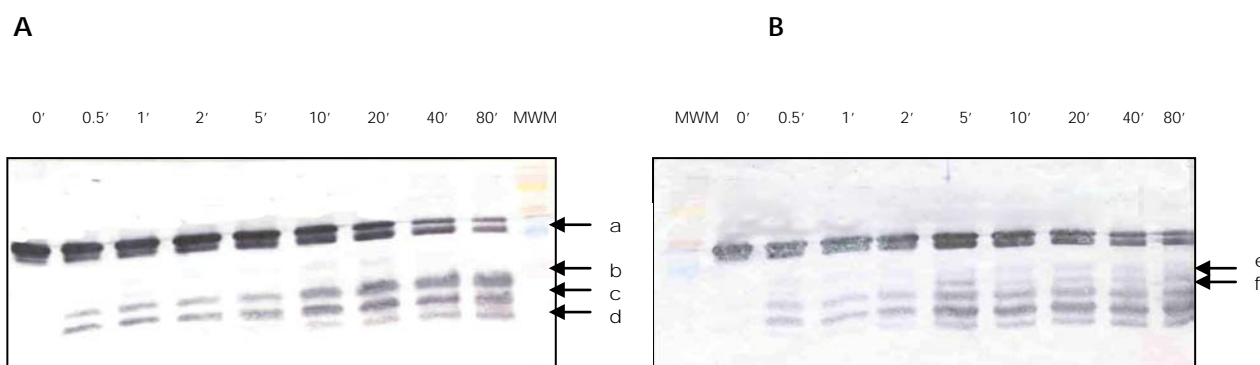


Figura V.10: Proteólisis limitada con Tripsina.

Los productos de digestión fueron analizados por SDS-PAGE y *western blot*. Los experimentos de proteólisis para apo AI (panel A) y apo AI-LPS (panel B) se realizaron utilizando relación molar apo AI:tripsina 200:1 en buffer Tris pH 7.4.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se sembraron 2 μ g de proteína.

MWM: Marcadores de peso molecular, Rainbow (Pharmacia). La banda rosa corresponde a 30 kDa y la banda celeste corresponde a 21 kDa. Los fragmentos de proteólisis obtenidos se señalan con flechas y una letra, adjudicada para su identificación.

Al realizar la digestión de la apo AI incubada con LPS (figura V.10 panel B), se observan los mismos 4 fragmentos que aparecen en la proteólisis de apo AI (a, b, c y d) junto con otros de peso molecular intermedio (designados como e y f). Las bandas de mayor intensidad siguen siendo los fragmentos b y c, pero la aparición de las bandas e y f sugiere que, como consecuencia de la interacción de apo AI con el LPS, hay pérdida de conformación en la proteína que genera la exposición de regiones de apo AI susceptibles al clivaje por Tripsina, que en la estructura nativa de la proteína se encuentran ocultas.

V.3.5- Espectros de dicroísmo circular.

Las medidas de dicroísmo circular son muy sensibles a la quiralidad del entorno. La región lejana del espectro de absorción de las proteínas (far-UV, 190-240 nm) es dominado por la absorbancia del enlace peptídico y provee de información acerca de la estructura secundaria de las proteínas, debido a que cada tipo de estructura secundaria (α -hélice, hoja plegada β , *random coil*) posee efecto diferente sobre el entorno quiral del enlace peptídico.

Para determinar si por efecto de la interacción con el LPS se modifica la estructura secundaria de la apo AI, se midieron espectros de CD en la región lejana de muestras de apo AI y apo AI-LPS (Figura V.11).

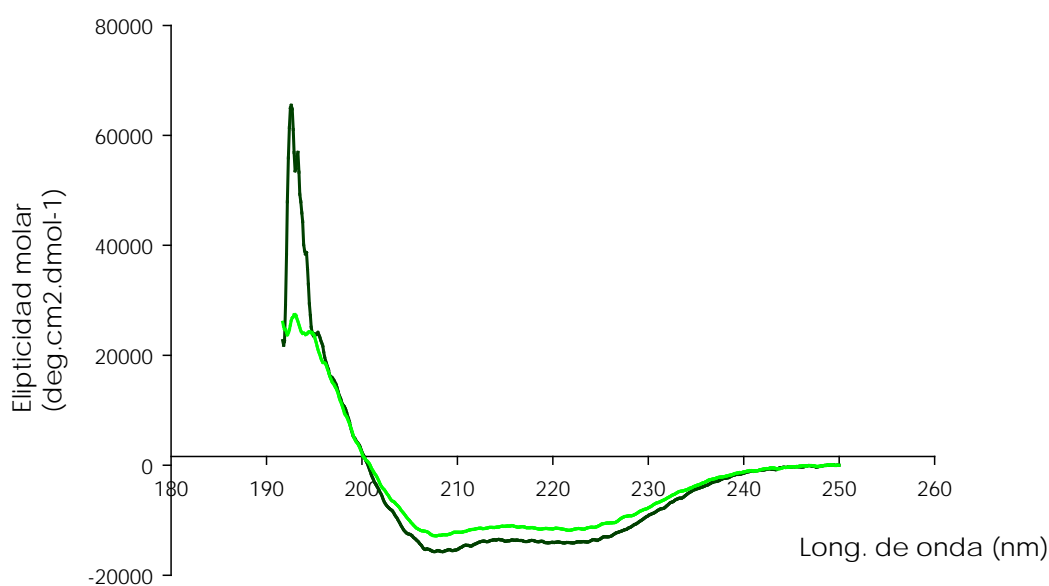


Figura V.11: Espectros de dicroísmo circular (CD) de la región lejana del espectro de muestras de apo AI en presencia (--) y ausencia (--) de LPS en buffer 50 mM fosfato de sodio, 100 mM NaCl, pH 7
Apo AI:LPS 1:2.8 mol:mol, 100 μ g/ml proteína.

En los espectros de CD de la región lejana de ambas muestras se observan dos picos negativos a 222 y 208 nm y un pico positivo a 193

nm, característicos de estructura α -hélice, por lo tanto la presencia de LPS no modifica el tipo de estructura secundaria predominante en la apo AI.

El contenido de α -hélice de la apo AI, estimado en base a la intensidad del pico de 222 nm, es del 55%, en concordancia con datos obtenidos por otros autores (Dalton, 1993), mientras que en presencia de LPS disminuye el contenido de α -hélice a un 46%. El número de residuos en conformación α -hélice es de 131 para apo AI y de 112 para apo AI-LPS. Estos datos sugieren que en presencia de LPS hay un menor plegamiento de la apo AI, lo cual podría implicar que la interacción de la apo AI con el LPS da lugar al desplegamiento de porciones α -hélice en alguna región de la proteína.

La estabilidad de la apo AI en solución depende de la interacción electrostática entre las porciones N-terminal y C-terminal de la proteína, la delección de alguna de dichas porciones da lugar al desplegamiento helicoidal en alguna porción de la molécula (Fang, 2003). En experimentos de dicroísmo circular realizados por Fang *et al* (Fang, 2003) sobre mutantes de apo AI con sus porciones N- o C-terminal truncadas se observó un menor contenido α -helicoidal y menor cooperatividad en el proceso de desplegamiento térmico.

En los experimentos de dicroísmo circular realizados en este trabajo de tesis se observó una disminución en el contenido α -hélice de la apo AI, en presencia de LPS y también se observó por medio de las curvas de desnaturalización con GndHCl una menor cooperatividad en el proceso de desplegamiento de apo AI-LPS. En base a nuestros resultados y a lo expuesto por Fang *et al* (Fang, 2003), si el LPS interactúa con el N-t o el C-t de la apo AI estaría interrumpiendo la interacción estabilizadora de ambas porciones y como consecuencia se perdería estructura α -hélice global de la proteína. Debido a que los experimentos realizados con NBS y ANS demuestran que el N-terminal no está

involucrado en la interacción con el LPS, la porción involucrada podría ser el extremo C-terminal de la apo AI.

V.3.6- Ensayos de cross-linking entre apo AI y ^{125}I -ASD-LPS.

Con el objetivo de determinar si existe una interacción directa entre la apo AI y el LPS, se realizaron ensayos de entrecruzamiento entre la apo AI y ^{125}I -ASD-LPS (5 μg) incubados en relación molar (1:2.8 apo AI:LPS) y sometidos a fotólisis, como fue descrito en la sección Materiales y métodos.

Se realizó una corrida electroforética sobre la muestra y la unión del LPS a la apo AI fue observada por incorporación de ^{125}I en la apo AI detectado por la radiactividad del ^{125}I sobre el gel, como se muestra en la Figura V.12, corroborando así la interacción directa de apo AI-LPS.

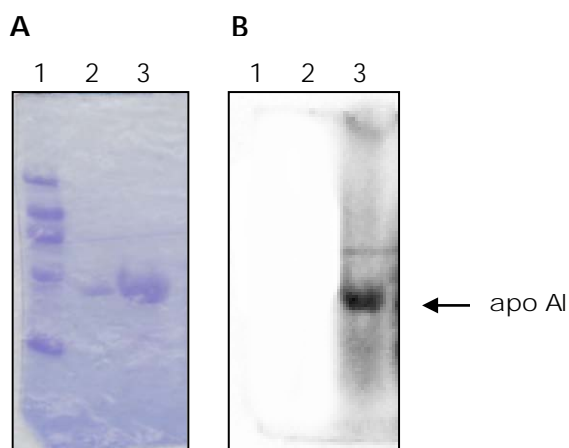


Figura V.12: Cross-linking entre apo AI y ^{125}I -ASD-LPS.

Panel A: SDS-PAGE 4-25% teñido con Coomassie-Blue para visualizar apo AI.

Panel B: el mismo gel fue expuesto y escaneado en scanner modelo Storm 840, para visualizar la radiactividad del ^{125}I .

Calles: 1-LMW, 2- std apo AI, 3- apo- ^{125}I -LPS-ASD.

V.3.7- Clivaje de apo AI y apo AI-LPS con CNBr.

Con la finalidad de determinar que porción de la proteína está involucrada en la interacción con el LPS, se realizó proteólisis controlada de la proteína, con CNBr. El CNBr corta enlaces peptídicos que involucran residuos metionina.

La apo AI posee 3 residuos metionina en su secuencia de aminoácidos (Met 86, Met 112 y Met 148), por lo tanto el clivaje completo con CNBr daría lugar a 4 péptidos: 1-86 (10 kDa), 87-112 (3 kDa), 113-148 (4 kDa) y 149-243 (10 kDa). Debido al clivaje incompleto también pueden obtenerse los péptidos 87-243 (18 kDa), 1-148 (17 kDa), 113-243 (15 kDa), 1-112 (13 kDa) y 87-148 (7 kDa) (Figura V.13). A todos los péptidos se les puede asignar una secuencia, teniendo en cuenta su peso molecular y considerando datos de bibliografía (Córsico, 2001).

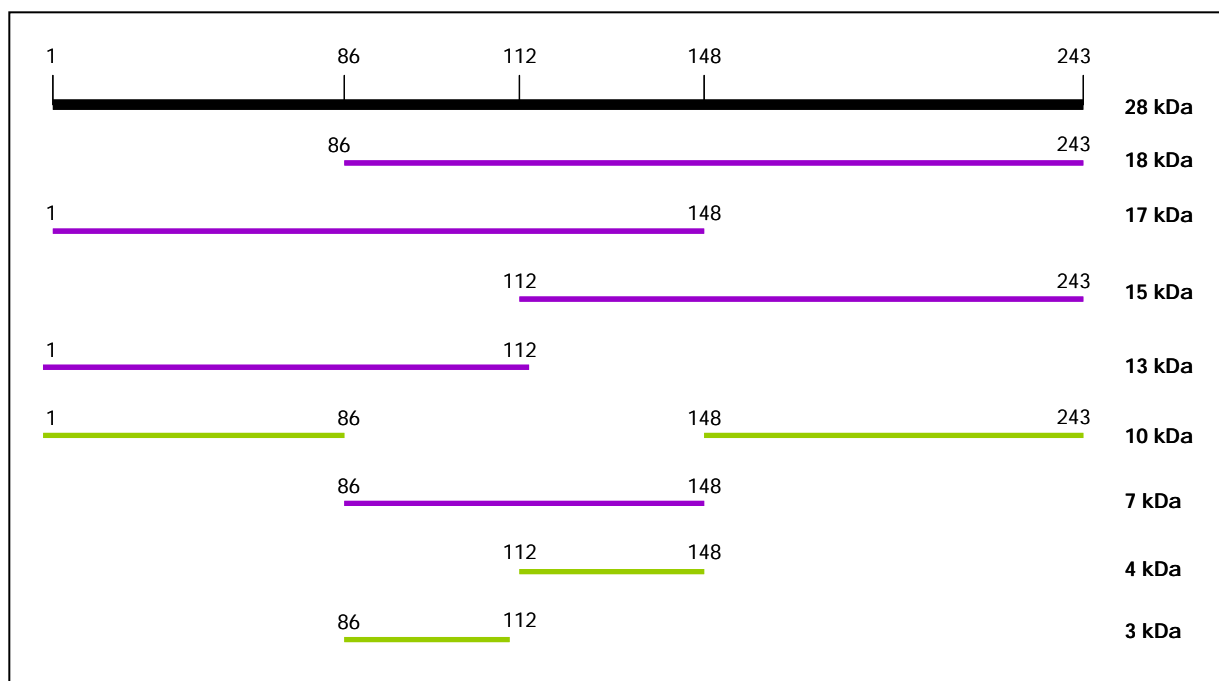


Figura V.13: Esquema de los fragmentos de proteólisis completa (--) e incompleta (--) de apo AI con CNBr.

En la figura V.14A se muestra en gel de Tricina-SDS-PAGE el patrón de proteólisis de apo AI-¹²⁵I-ASD-LPS (1:2.8 mol:mol) obtenido en los

experimentos realizados en este trabajo de tesis. Pueden observarse 8 fragmentos de proteólisis asignados con las letras A-H.

Se mandaron a secuenciar las bandas de menor peso molecular que poseen marca radiactiva (E, F y H), para determinar su identidad.

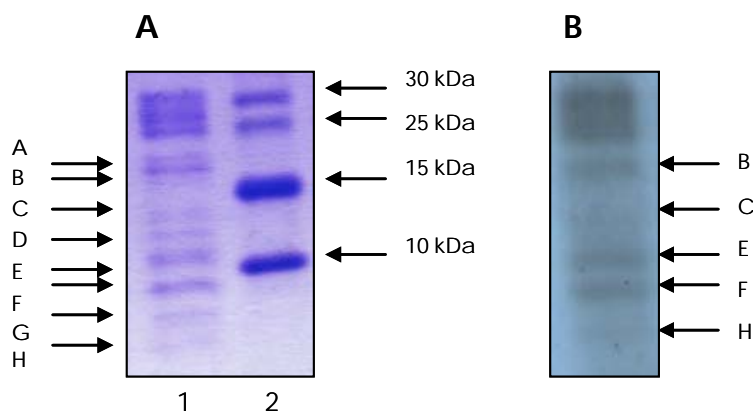


Figura V.14: Análisis en geles de Tricina-SDS-PAGE y autorradiografía del clivaje con CNBr de apo AI-¹²⁵I-ASD-LPS

Panel A: Gel en sistema Tris-Tricina teñido con coomasie para detectar las bandas de proteína. Las flechas señaladas con letras, a la izquierda indican los fragmentos proteolíticos, las flechas de la derecha señalan los marcadores de peso molecular.

Calles: 1- protéolisis de apo AI-¹²⁵I-LPS-ASD, 2- LMW (Farmacia).

Panel B: el mismo gel expuesto en placas X-Omat (Kodak) para detectar la radiactividad del ¹²⁵I, las flechas señalan los fragmentos marcados radiactivamente.

El secuenciamiento de las bandas seleccionadas fue realizado en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LaNaiS-Pro, Universidad de Buenos Aires-CONICET). Se secuenciaron los 6 primeros aminoácidos de cada uno de los fragmentos a analizar. La banda E fue identificada con la secuencia Nt DEPPQX, la banda F con la secuencia RDRARA y la banda H con los

aminoácidos ELYRQK. En base a las secuencias obtenidas, a la secuencia de la apo AI y a los pesos moleculares correspondientes a cada banda, se puede determinar que E, F y H corresponderían a los fragmentos 113-148, 148-243 y 1-112, respectivamente.

El análisis autorradiográfico (Figura V.14B) muestra marca radiactiva debida al ^{125}I en las bandas designadas como B, C, E, F y H. Puede observarse un grado de marcado diferencial en los fragmentos, debido posiblemente a diferencias en afinidad con el LPS. Los fragmentos proteolíticos marcados con ^{125}I corresponden a diferentes porciones de la proteína, sugiriendo que el LPS no se une a una única región de la misma. Sin embargo el mayor nivel de marca se encuentra en el fragmento C-terminal.

Los resultados presentados en este capítulo de tesis sugieren que la interacción de la apo AI con el LPS no involucra la porción N-terminal de la proteína y que dicha interacción altera la estabilidad de la apo AI, demostrado por experimentos de CD y proteólisis con Tripsina. La estabilidad, mediada por interacciones intramoleculares entre las porciones Nt y Ct, se pierde por interacción del LPS con la porción C-terminal de la proteína. Con los datos obtenidos del experimento de proteólisis con CNBr se puede deducir que el LPS no se une preferencialmente a alguna porción de la apo AI y que la unión del LPS a las diferentes regiones de la proteína puede estar dirigida tanto por fuerzas electrostáticas, entre las cargas negativas de la porción lípido A del LPS y las cargas positivas de la apo AI, como por fuerzas hidrofóbicas.

V.4- Bibliografía.

- Brewer, HJ, Fairwell, T, LaRue, A, *et al.* The amino acid sequence of human Apo A-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1978), 623-630.
- Córsico, B, Toledo, J, Garda, H. Evidence for a central apolipoprotein AI domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), 16978-16985.
- Chen, Y, Yang, J, Martinez, H. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotary dispersion. *Biochemistry* 11 (1972), 4120-4131.
- Dalton, M, Swaney, J. Structural and functional domains of apolipoprotein AI within high density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993), 19274-19283.
- Davidson, W, Hazlett, T, Mantulin, W, *et al.* The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), 13605-13610.
- Davidson, WS, Arnvig-McGuire, K, Kennedy, A, *et al.* Structural organization of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I: studies of tryptophan mutants *Biochemistry* 38 (1999), 14387-14395.
- Emancipator, K, Csako, G, Elin, R. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoprotein and apolipoprotein. *Infection and Immunity.* 60 (1992), 596-601.
- Fang, Y, Gursky, O, Atkinson, D. Structural studies of N- and C-terminally truncated human apolipoprotein AI. *Biochemistry* 42 (2003), 6881-6890.
- Gursky, O, Atkinson, D. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-I: implications for a lipid-free molten globular state *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), 2991-1995.
- Hui-hua, L, Lyles, DS, Thomas, MJ, *et al.* Structural determination of lipid-bound ApoA-I using fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 37048-37054.

- Ji, Y, Jonas, A. Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), 11290-11297.
- Kiss, RS, Kay, CM, Ryan, RO. Amphipathic α -Helix Bundle Organization of Lipid-Free Chicken Apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 38 (1999), 4327-4337.
- Levine, D, Parker, T, Donnelly, T, *et al.* In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 (1993), 12040 -12044.
- Long-Sen, C, Her-Ya, W., Jen-Jung, H., and Chung-Chang, C. Energy transfer from tryptophan residues of proteins to 8-anilino-1-naphthalene-sulfonate. *J. Protein Chem* 13 (1994), 635-640.
- Ma, J, Liao, X, Lou, B, *et al.* Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Biochim. Biophys. Acta Sin (Shanghai)* 36 (2004), 419-424.
- Marcel, Y, Provost, P, Koa, H, *et al.* The epitopes of apolipoprotein AI define distinct structural domains including a mobile middle region. *J Biol Chem.* 266 (1991), 3644-3653.
- Massamiri, T, Tobias, P, Curtiss, L. Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein A-I. *J. Lipid. Res.* 38 (1997), 516-525.
- Myers, J, Pace, C, Scholtz, J. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* 4 (1995), 2138-2148.
- Ohnishi, M, Kawagishi, T, Abe, T, *et al.* Stopped-flow studies on the chemical modification with N-bromosuccinimide of model compounds of tryptophan residues. *J. Biochem* 87 (1980), 273-279.
- Pace, C. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131 (1986), 266-280.

- Park, C, Wright, S. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 18054-18060.
- Parker, T, Levine, D, Chang, J, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infection and Immunity.* 63 (1995), 253-258.
- Roberts, LM, Ray, MJ, Shih, TW, *et al.* Structural Analysis of Apolipoprotein A-I: Limited Proteolysis of Methionine-Reduced and -Oxidized Lipid-Free and Lipid-Bound Human Apo A-I. *Biochemistry* 36 (1997), 7615-7624.
- Rogers, D, *al., e.* Structural analysis of apolipoprotein AI: Effects of amino-and-carboxy-terminal deletions on the lipid-free structure. *Biochemistry* 37 (1998), 945-955.
- Schägger, H, von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166 (1987), 368-379.
- Schmid, F. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes in Protein Structure: A Practical Approach. (Creighton, T. E., Ed. IRL, Oxford, New York, and Tokyo (1989), 251.
- Segrest, J, Jones, M, De Loof, H, *et al.* The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 33 (1992), 141-166.
- Sorci-Thomas, M, *et. al.* Single repeat deletion in apo AI blocks cholesterol esterification and results in rapid catabolism of D6 and wild type apo AI in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 12156-12163.
- Sorci-Thomas, MG, Thomas, MJ. The effects of altered apolipoprotein AI structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc. Med.* 12 (2002), 121-128.
- Stryer, L. Fluorescence spectroscopy of proteins. *Science* 162 (1968), 526-533.

- Stryer, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of nonpolar binding sites. *J. Mol. Biol.* 13 (1965), 482-495.
- Tricerri, A, Córscico, B, Toledo, J, *et al.* Conformation of Apolipoprotein A-I in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol. *Biochem et Biophys Acta* 1391 (1998), 67-78.
- Ulevitch, RJ. The preparation and characterization of a radioiodinated bacterial lipopolysaccharide. *Immunochemistry* 15 (1978), 157-164.
- Wollenweber, HW, Morrison, DC. Synthesis and biochemical Characterization of a Photoactivatable, Iodinatable, Cleavable Bacterial Lipopolysaccharide Derivative. *Journal of Biological Chemistry* 260 (1985), 15068-15074.
- Wu, A, Hinds, C, Thiemermann, C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 21 (2004), 210-221.
- Yan, Y, Li, Y, Lou, B, *et al.* Beneficial effects of ApoA-I on LPS-induced acute lung injury and endotoxemia in mice. *Life Sciences Volume* 79 (2006), 210-215.
- Zhu, H, Atkinson, D. Conformation and lipid binding of the N-terminal (1-44) domain of human apolipoprotein A1. *Biochemistry* 43 (2004), 13156-13164.

Capítulo VI: Neutralización de la actividad endotóxica del LPS.

Capítulo VI: Neutralización de la actividad endotóxica del LPS.

VI.1- Introducción.

A pesar de los avances en las terapias antimicrobianas y antiinflamatorias, la sepsis continúa siendo una de las principales causas de muerte en pacientes hospitalizados.

La ausencia de modalidades terapéuticas específicas para el tratamiento del shock séptico ha generado una variedad de enfoques experimentales, uno de los cuales es la utilización de algún agente que pueda unirse y secuestrar LPS, previniendo su reconocimiento por las células efectoras. La estrategia de secuestro de LPS, históricamente, ha sido dirigida al uso de anticuerpos anti-LPS diseñados contra las regiones estructurales conservadas de la endotoxina, para su unión y neutralización (Siegel, 1995), (Cross, 1994) o anticuerpos anti-TNF- α para capturar el TNF- α liberado por los macrófagos, luego de su inducción por LPS. De todos modos estas estrategias poseen un éxito limitado (Fisher, 1993) ya que varios estudios clínicos hasta el momento han fallado (Cross, 1994), (Ziegler, 1982), (Baumgartner, 1985), (Cross, 1994) .

A su vez, una gran desventaja de varios de los antibióticos utilizados en la terapia contra el shock séptico es que provocan la liberación de vesículas de membrana externa (VME) de las bacterias hacia la circulación. Para evitar estos efectos, una nueva estrategia para el tratamiento de infecciones por Gram-negativos es la utilización de péptidos anti-microbianos endógenos de origen no inmunológico, que poseen la capacidad de producir la muerte bacteriana y detoxifican el LPS (Evans, 1995), (von der Mohlen, 1995), (Appelmelk, 1994), (Marra,

1994), (Gazzano-Santoro, 1992), (Ooi, 1991), (Marra, 1990), (Elsbach, 1998), (Elsbach, 1998), (Levy, 2000), (Levy, 2001).

Alternativamente, un campo en crecimiento es el desarrollo de proteínas o péptidos con carga positiva que naturalmente interactúan con la endotoxina y que son capaces de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por LPS, como lactoferrina (Brandenburg, 2001), (Caccavo, 2002), CAP 18 (Larrick, 1995), NK-lisina (Bruhn, 2003), (Andersson, 1999), PMB (Storm, 1977), (Brandenburg, 2002), defensinas (Ganz, 1995) o pequeños péptidos sintéticos y recombinantes derivados de PMB, BPI, CAP-18 entre otros (Epand, 1999), (Thomas, 2001), (Blondelle), (Zhang, 1999).

Muchas de estas proteínas y péptidos catiónicos inducen lisis de los microorganismos por perturbación o ruptura de las membranas (Nizet, 2001), e inhiben la respuesta inflamatoria inducida por LPS (Wiese, 2003).

El mecanismo por el cual los péptidos y proteínas que unen LPS producen la muerte de los microorganismos varía entre las diferentes moléculas, pero está documentado y aceptado que la carga neta negativa de las membranas es el blanco principal, más que la presencia de un receptor específico (Hristova, 1997), (Wang, 1998).

A pesar de que los péptidos antibacterianos son diversos en tamaño, estructura y actividades, la mayoría son anfipáticos y poseen superficies catiónicas e hidrofóbicas y es crucial que los péptidos anfipáticos diseñados para unir LPS, posean una clara segregación de dominios cargados y apolares, y preferentemente una orientación cabeza-cola (polar) de las regiones catónicas/hidrofóbicas (David, 2000). Estas características facilitan su interacción con las membranas cargadas negativamente de la superficie bacteriana, seguida de la inserción en la muerte del microorganismo (Gennaro, 2000), (Hancock, 2000), (Lehrer, 1993), (Risso, 2000).

La proteína BPI (bactericidal/permeability increasing protein) interrumpe la arquitectura asimétrica de la membrana externa de las bacterias dando lugar a la degradación de los fosfolípidos por las fosfolipasas bacterianas y del huésped (Elsbach, 1998), (Levy, 2000), (Levy, 2001), (Calafat, 2000). Una superficie cargada negativamente en las membranas es un parámetro importante para la interacción de BPI con las mismas (Wiese, 2003).

El péptido CAP18, perteneciente a la familia de las catelicidinas, posee actividad antimicrobiana y exhibe capacidad de unión y neutralización del LPS (Hirata, 1995). Tanto CAP-18, PMB y los péptidos defensinas, producen la muerte bacteriana por unión al LPS seguida de la permeabilización de las membranas externa e interna de las bacterias, generando despolarización (Wiese, 2003), (Sawyer, 1988), (Lehrer, 1989), (Vaara, 1992).

Andra *et al* (Andrä, 2004) desarrollaron un péptido derivado de NK-lisina, NK-2, que reduce la formación de poros e interactúa fuertemente con el LPS inhibiendo la producción de TNF- α inducida por la endotoxina.

El péptido sintético derivado de la proteína lactoferrina humana, denominado HLP-2, causa desestabilización de la membrana provocando la muerte bacteriana y posee la capacidad de unir LPS (Chapple, 1998). Este péptido adquiere estructura de hoja plegada luego de la unión al LPS, con una cara antipática de residuos cargados (Chapple, 2004).

Con la misma perspectiva de buscar terapias contra el shock séptico, muchos autores han demostrado la capacidad de las HDL y rHDL de neutralizar la toxicidad del LPS (Levine, 1993), (Calabresi, 1997), pero aunque estos resultados sugieren que la administración de HDL puede ser efectiva en el tratamiento de la sepsis, la obtención de cantidades terapéuticas de la lipoproteína es impracticable (Gupta, 2005).

Diversos autores han demostrado que el efecto neutralizante de las HDL se debe principalmente a la interacción entre el LPS y la apo AI, componente proteico mayoritario de las HDL (Kitchens, 2003), (Ma, 2004). Sin embargo otros autores demostraron que la neutralización del LPS está relacionada con el componente fosfolipídico de las partículas lipoproteicas (Parker, 1995), (Wurfel, 1997).

Gupta *et al* (Gupta, 2005) desarrolló un péptido mimético de apo AI, denominado L4F, que inhibe la respuesta inflamatoria inducida por el LPS y el lípido A. Dichos autores proponen que L4F se une al lípido A previniendo así la interacción del LPS con la LBP y los receptores de superficie, inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias. Postulan que los efectos inhibitorios están relacionados con la naturaleza anfipática del péptido.

Gordon *et al* (Gordon, 2005) testeó emulsiones de fosfolípidos libres de proteínas en voluntarios humanos. Los resultados de dicho estudio apoyan la teoría de que niveles de fosfolípidos aumentados en sangre pueden promover la neutralización de LPS *in vivo* y provee evidencia adicional para el importante rol que juegan los lípidos en el metabolismo de la endotoxina.

El desarrollo de terapias adecuadas contra el shock séptico sigue siendo un desafío. Con este propósito y dentro del marco de los objetivos planteados en este trabajo de tesis, se decidió estudiar si la apo AI, el fragmento de proteólisis de apo AI con CNBr denominado banda F y suspensiones de liposomas, poseen la capacidad de neutralizar la toxicidad del LPS, con la esperanza a largo plazo de definir una terapia eficiente contra las infecciones por Gram-negativas.

VI.2- Materiales y métodos.

VI.2.1- Materiales.

La apo AI fue obtenida por el método de purificación descrito en materiales y métodos generales (Tricerri, 1998). LPS de *E.coli* 0111:B4 (Sigma). Kit OptEIA para la determinación de TNF- α (BD).

VI.2.2- Ensayos de actividad antimicrobiana de apo AI.

Dado que una característica común de los péptidos que unen LPS es que poseen actividad antimicrobiana, se realizaron ensayos de la actividad de apo AI sobre cultivos de *E. coli* JM109.

Se realizó un cultivo *over-night* (On) de *E.coli* JM 109 en medio líquido LB a 37°C con agitación continua. Luego 2 ml del cultivo On fueron inoculados en 20 ml de medio fresco LB y se dejó crecer las bacterias a 37°C, con agitación hasta una $DO_{600nm}=0.65$. Luego se realizaron diluciones seriadas al 1/2 de apo AI en placas de 96 pocillos sobre 100 μ l de la suspensión de bacterias en fase log de crecimiento, cargados en los diferentes pocillos de la placa. Para las diluciones seriadas se preparó un stock de apo AI 1 mg/ml en buffer A estéril, 100 μ l del stock de apo AI (100 μ g) fueron colocados en el primer pocillo. Las placas fueron incubadas por 2 hs a 37°C, con agitación constante. Luego de las 2 hs la viabilidad de las células fue estimada por medidas de DO_{600nm} utilizando un lector de placas modelo Beckman Coulter DTX 880, multimode detector.

VI.2.3- Purificación por electroelución de uno de los fragmentos de apo AI obtenido por proteólisis con CNBr.

En el capítulo V se realizaron ensayos de proteólisis con CNBr y se determinaron los fragmentos de apo AI con capacidad de unión de LPS.

Para los ensayos realizados en este capítulo de tesis, se purificó por el método de electroelución uno de los fragmentos obtenidos, con el fin de testear su capacidad neutralizante de la endotoxicidad del LPS.

Luego del proceso de proteólisis con CNBr, los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en un sistema de geles Tris-Tricina y el producto de proteólisis, denominado en el capítulo V como banda F correspondiente a la porción de apo AI que abarca los aminoácidos 148-243, fue aislado a partir del gel por el proceso de electroelución (Hager, 1980), (Ohhashi, 1991) utilizando un equipo BioRad.

La muestra del fragmento obtenida fue concentrada y su pureza fue chequeada por SDS-PAGE. La concentración de la muestra fue determinada por Lowry (Lowry, 1951).

VI.2.4- Ensayos de neutralización de la toxicidad del LPS. Determinaciones de liberación de TNF- α por ELISA.

A lo largo de este trabajo de tesis se estudió la interacción del LPS con membranas (liposomas) y con apo AI y sus fragmentos proteolíticos. Una vez estudiada la interacción, en este capítulo, se procedió a evaluar si los liposomas, la apo AI y el fragmento F poseen también la capacidad de neutralizar la endotoxicidad del LPS.

Con dicha finalidad se utilizaron cultivos de macrófagos de la línea celular RAW 264.7 y se cuantificó la liberación de TNF- α por parte de las células, luego de estimular la producción de la citoquina por incubación con LPS (10 ng/ml) o mezclas MLV-DMPC:LPS (1:1 y 10:1 p/p), apo AI:LPS (1:1 y 10:1 p/p) y fragmento F:LPS (1:1 y 10:1 p/p). Las mezclas fueron previamente incubadas por 30 minutos a 37°C.

Se realizaron cultivos de células RAW 264.7 hasta confluencia, en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio DMEM. Luego se extrajo el medio de cultivo y se lo reemplazó por medio fresco (2 ml) suplementado con

LPS o las mezclas correspondientes y se continuó el crecimiento por 4 horas a 37°C y 5% CO₂, para la estimulación de la producción de TNF- α por parte de las células. Luego de las 4 horas de cultivo, se tomaron los sobrenadantes, se centrifugaron por 10 minutos a 4000 x g y se almacenaron a -20°C hasta su utilización para los ensayos inmunológicos.

La determinación de TNF- α se realizó por medio de ensayos de ELISA tipo sándwich utilizando el kit OptEIA (BD). Brevemente, se colocó en cada pocillo de la placa de ELISA, 100 μ l del anticuerpo de captura (anti-TNF- α producido en ratón kit OptEIA)(1/250 en buffer PO₄Na 0.2M, pH 6.5) y se incubó a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-0.05% tween 20 y se dejó bloqueando por 1 hora a 25 C con 200 μ l de buffer PBS-10% suero fetal bovino. Se realizaron 3 lavados con PBS-0.05% tween 20 y se dejó por 2 horas a 25°C con 100 μ l de la dilución correspondiente de la muestra a ensayar, la dilución se realizó en buffer PBS-10% suero fetal bovino. Luego de 5 lavados con PBS-tween, se incubó la placa a 25°C por 1 hora con 100 μ l de solución *working detector* (kit OptEIA). Se lavó la placa 7 veces con PBS-tween y se agregaron 100 μ l de *substract solution* (kit OptEIA), se incubó por 30 minutos a 25°C en oscuridad y luego se frenó la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 2N. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880, multimode detector y la concentración de TNF- α de cada pocillo se determinó según la curva de dilución del standard utilizando TNF- α (kit OptEIA).

VI.3- Resultados y discusión.

VI.3.1- Ensayos de actividad antimicrobiana de apo AI.

Muchas de las proteínas y péptidos que unen LPS poseen actividad antimicrobiana (Chapple, 2004), (Andra, 2007), (Okuda, 2006), (Andrà, 2004), y se ha propuesto que dicha capacidad también está relacionada con la neutralización de la endotoxicidad del LPS.

Dado que la apo AI posee características comunes a la mayoría de estos péptidos y proteínas que unen LPS, tales como anfipaticidad y la presencia de residuos cargados positivamente, se procedió a estudiar si posee actividad antimicrobiana, midiendo su eficiencia en la inhibición del crecimiento de *E. coli* JM109.

Como se muestra en la figura VI.1, la apo AI posee la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, demostrado por la disminución en la DO a 600nm, en función de la concentración de proteína.

La membrana bacteriana externa es asimétrica, contiene en la cara externa LPS (glicolípido polianiónico) y fosfolípidos en la cara interna. Para estabilizar la superficie aniónica de la membrana externa, el LPS es parcialmente neutralizado por los cationes divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} . Los péptidos catiónicos pueden interactuar con los sitios de unión a los cationes divalentes en el LPS, distorsionando la integridad de la membrana externa (Chapple, 2004).

La interacción de los péptidos con el LPS es dirigida por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas. La interacción concertada de una superficie policatiónica con la membrana externa puede generar una disrupción de la membrana bacteriana, permitiendo la translocación de las moléculas de péptidos a través de la membrana externa y así acceder a los blancos necesarios para generar la muerte bacteriana (Chapple, 2004).

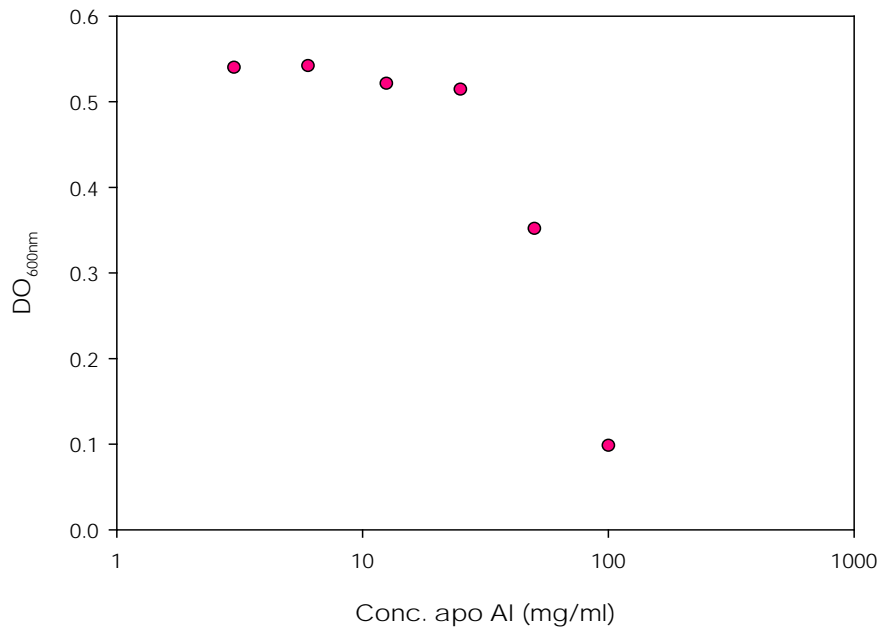


Figura VI.1: Efecto antimicrobiano de apo AI sobre *E.coli* JM109, en medio líquido. Curva de DO_{600nm} vs concentración de proteína. La viabilidad bacteriana se determinó midiendo DO_{600nm}.

La interacción hidrofóbica proteína-LPS es necesaria para una actividad antimicrobiana eficiente ya que la proteína debe atravesar la barrera generada por las cadenas hidrofílicas hidrocarbonadas del LPS. Esto toma lugar solo luego de que la saturación de las cadenas hidrocarbonadas con los péptidos catiónicos ha ocurrido y esto explica la necesidad de mayores concentraciones de péptido para neutralizar LPS liso y a su vez matar a la bacteria (Andrä, 2004). Esto podría explicar la alta concentración de apo AI necesaria para generar la muerte bacteriana ya que la cepa bacteriana utilizada, *E.coli* JM109, posee LPS liso.

VI.3.2- Neutralización de la endotoxicidad del LPS por apo AI y por el fragmento proteolítico denominado banda F.

Una vez comprobada la actividad antimicrobiana de la apo AI, se procedió a determinar si dicha proteína posee también capacidad neutralizante de la endotoxicidad del LPS.

TNF- α es una de las principales citoquinas sintetizadas y secretadas por los macrófagos luego de su estimulación con LPS. El efecto neutralizante de la apo AI y del fragmento F, proveniente de la proteólisis de apo AI con CNBr, fue testeado sobre células de la línea RAW 264.7 luego de la estimulación con LPS, monitoreando la liberación de TNF- α por ELISA.

Para realizar los ensayos de neutralización, el fragmento F (aa 148-243) fue elegido entre todos los fragmentos proteolíticos, debido a que mostró mayor marca radiactiva en los ensayos de entrecruzamiento con ^{125}I -ASD-LPS.

La estimulación de las células con LPS, resultó en una producción de TNF- α de aproximadamente 23.500 pg/ml y 26.850 pg/ml para las placas de ELISA de apo AI y fragmento F, respectivamente. Este valor de TNF- α fue considerado como el 100% de liberación en cada caso.

La pre-incubación de LPS (10 ng/ml) con apo AI en dos concentraciones diferentes, resultó en una reducción de los niveles de TNF- α liberado por las células (Figura VI.2A). Un 42% de inhibición en la liberación de TNF- α fue observado para la relación apo AI:LPS 1:1(p/p) (13.500 pg/ml). Para la relación apo AI:LPS 10:1(p/p) la liberación de citoquina fue inhibida en un 85% (3.500 pg/ml).

Respecto al fragmento F (Figura VI.2B), su incubación con LPS también provocó una disminución en los valores de TNF- α liberados por las células. La liberación de citoquina se inhibió en un 35% (17.600 pg/ml)

y en un 90% (2.700 pg/ml) para las relaciones fragmento F:LPS 1:1 y 10:1 (p/p), respectivamente.

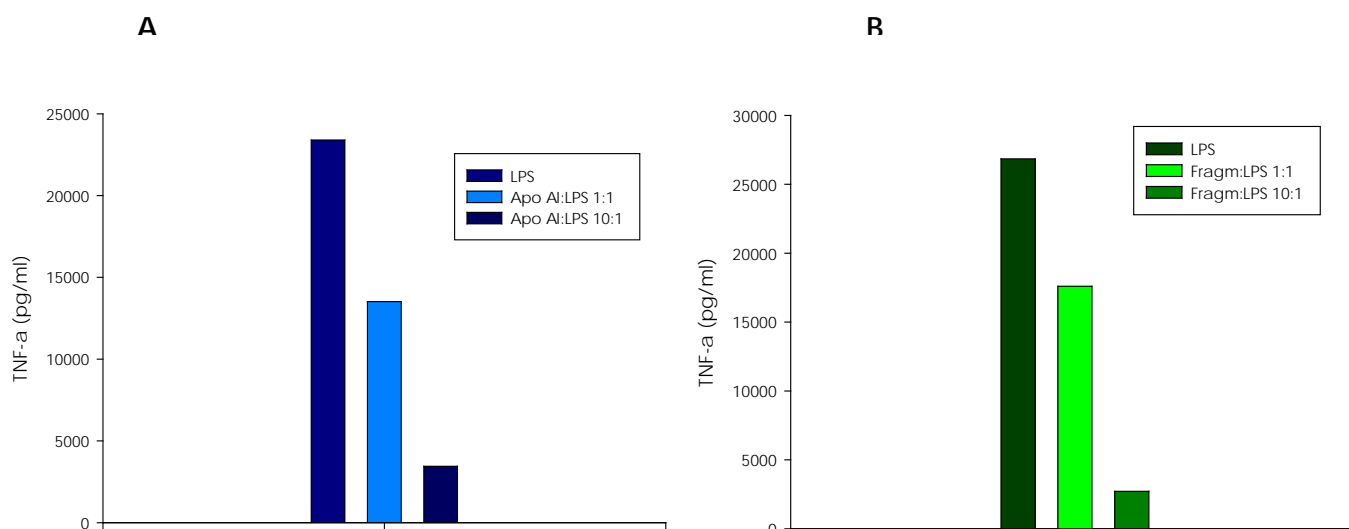


Figura VI.2: Liberación de TNF-α por células RAW 264.7 luego de la incubación con LPS (10 ng/ml) y mezclas apo AI:LPS (Panel A) y Fragmento F:LPS (Panel B) en relaciones 1:1 y 10:1 (p/p).

Estos resultados confirman la capacidad neutralizante de la toxicidad del LPS tanto de la apo AI como del fragmento F.

El hecho de que los niveles de inhibición en la liberación de TNF-α sean similares para ambas moléculas, apoya la hipótesis de que la capacidad neutralizante de apo AI se encuentra en su porción C-terminal.

VI.3.3- Neutralización de la endotoxicidad del LPS por liposomas neutros, en solución.

Muchos trabajos han reportado la capacidad moduladora de la actividad biológica del LPS por medio de su incorporación en liposomas

(Dijkstra, 1987), (Dijkstra, 1988), (Trubetskoy, 1990) pero en dichos experimentos, el LPS es incorporado en la vesículas lipídicas durante su preparación por los métodos de deshidratación/rehidratación y de co-sonicación con los lípidos. En los experimentos realizados en este trabajo de tesis focalizamos en la capacidad de los liposomas de neutralizar la toxicidad del LPS cuando los liposomas se encuentran en solución en buffer salino adicionado con LPS.

Los experimentos se realizaron, al igual que para testear la capacidad neutralizante de apo A1 y fragmento F, midiendo la liberación de TNF- α por parte de las células RAW 264.7 y determinando por ELISA la concentración de citoquina producida.

La estimulación de las células con LPS solo, resultó en una producción de TNF- α de aproximadamente 29.500 pg/ml. Este valor de TNF- α fue considerado como el 100% de liberación de citoquina.

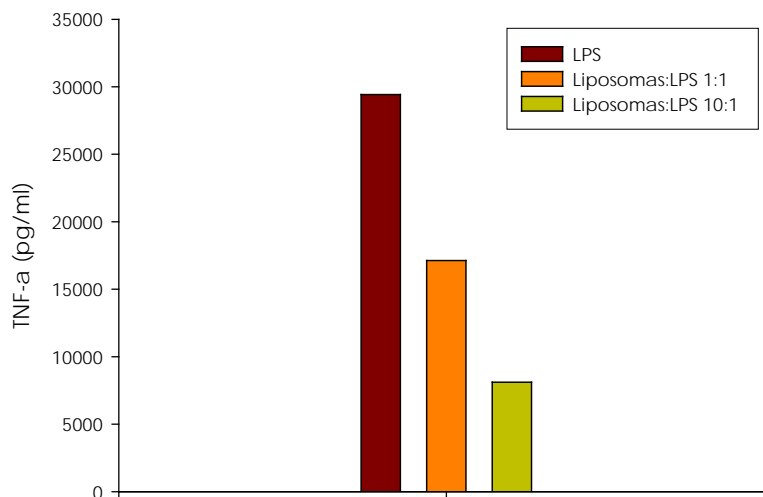


Figura VI.3: Liberación de TNF- α por células RAW 264.7 luego de la incubación con LPS (10 ng/ml) y mezclas liposomas:LPS 1:1 y 10:1 (p/p).

La pre-incubación de LPS (10 ng/ml) con liposomas multilamelares de DMPC (MLV-DMPC) en dos concentraciones diferentes, resultó en una reducción de los niveles de TNF- α liberado por las células (Figura VI.3). Un 42% de inhibición en la liberación de TNF- α fue observado para la relación liposomas:LPS 1:1(p/p) (17.100 pg/ml). Para la relación liposomas:LPS 10:1(p/p) la liberación de citoquina fue inhibida en un 73% (8.100 pg/ml).

En el capítulo IV demostramos que el LPS en solución se intercala en liposomas zwitteriónicos de fosfatidilcolina. En este capítulo demostramos que dicha intercalación es efectiva en neutralizar su capacidad endotóxica. La actividad biológica del LPS reside enteramente en su porción lípido A, por lo tanto es posible inferir que la inserción de las moléculas de LPS dentro de la bicapa fosfolipídica de los liposomas en solución, ocurre a través del dicho dominio. De esta forma, la endotoxicidad del LPS queda enmascarada y las moléculas de LPS unidas a los liposomas ya no pueden interactuar con las membranas de los macrófagos, paso requerido para la iniciación de la respuesta celular al LPS.

VI.4- Bibliografía.

- Andersson, M, Girard, A, Cazenave, J. Interaction of NK-lysin, a peptide produced by cytolytic lymphocytes, with endotoxin. *Infect Immun.* 67 (1999), 201-205.
- Andra, J, Howe, J, Garidel, P, *et al.* Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxin: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem J* 406 (2007), 297-307.
- Andrä, J, Michel, H, Koch, J, *et al.* Biophysical Characterization of Endotoxin Inactivation by NK-2, an Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48 (2004), 1593-1599.
- Appelmek, B, An, Y-Q, Thijs, B, *et al.* Recombinant human bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI₂₃) is a universal lipopolysaccharide-binding ligand. *Infect Immun.* 62 (1994), 3564-3567.
- Baumgartner, J, Glauser, M, McCutchan, J, *et al.* Prevention of Gram-negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid. *Lancet ii* (1985), 59-63.
- Blondelle, S, Jerala, R, Lamata, M, *et al.* Structure-function studies of antimicrobial and endotoxin neutralizing peptides. *In* M. Chorev and TK Sawye. (ed.), *Peptide revolution: genomics, proteomics and therapeutics*, in press. American Peptide Society. San Diego, Calif.
- Brandenburg, K, Jurgens, G, Muller, M, *et al.* Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by Lactoferrin. *Biol. Chem.* 382 (2001), 15-25.
- Brandenburg, K, Moriyon, I, Arraiza, M, *et al.* Biophysical investigations into the interaction of lipopolysaccharide with polymyxins. *Thermochim. Acta* 382 (2002), 189-198.

- Bruhn, H, Riekens, B, Berninghausen, O, *et al.* Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals-a comparative functional analysis. *Biochem J* 375 (2003), 737-744.
- Caccavo, D, Pellegrino, N, Altamura, M, *et al.* Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *J Endotoxin Res* 8 (2002), 403-417.
- Calabresi, L, Franceschini, G, Sirtori, C, *et al.* Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Comm* 238 (1997), 61-65.
- Calafat, J, Janssen, H, Knol, E, *et al.* The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is membrane-associated in azurophil granules of human neutrophils, and relocation occurs upon cellular activation. *APMIS* 108 (2000), 201-208.
- Cross, A. Antiendotoxin antibodies: a dead end. *Ann. Inter. Med.* 121 (1994), 58-60.
- Cross, A, Opal, S. Therapeutic intervention in sepsis with antibody to endotoxin: is there a future? *J Endotoxin Res* 1 (1994), 57-69.
- Chapple, D, Hussain, R, Joannou, C, *et al.* Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004), 2190-2198.
- Chapple, D, Mason, D, Joannou, C, *et al.* Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype 0111. *Infect Immun.* 66 (1998), 2434-2440.
- David, S, Awasthi, S, Balaram, P. The role of polar and facial amphipathic character in determining lipopolysaccharide-binding properties in synthetic cationic peptides. *Innate Immunity* 6 (2000), 249-256.

- Dijkstra, J, Larrick, J, Ryan, J, *et al.* Incorporation of LPS in liposomes diminishes its ability to induce tumoricidal activity and tumor necrosis factor secretion in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 43 (1988), 436-444.
- Dijkstra, J, Mellors, J, Ryan, J, *et al.* Modulation of the biological activity of bacterial endotoxin by incorporation into liposomes. *The Journal of immunology.* 138 (1987), 2663-2670.
- Elsbach, P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol* 64 (1998), 14-18.
- Elsbach, P, Weiss, J. Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defense. *Curr Opin Immunol* 10 (1998), 45-49.
- Epsand, R, Vogel, H. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 1462 (1999), 11-28.
- Evans, T, Carpenter, A, Moyes, D, *et al.* Protective effects of a recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in an animal model of gram-negative sepsis. *J. Infect. Dis.* 171 (1995), 153-160.
- Fisher, CJ, Opal, S, Dhainaut, J, *et al.* Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care Med* 21 (1993), 318-327.
- Ganz, T, Lehrer, R. Defensins. *Pharmacol Ther* 66 (1995), 191-205.
- Gazzano-Santoro, H, Parent, J, Grinna, L, *et al.* High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 60 (1992), 4754-4761.
- Gennaro, R, Zanetti, M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55 (2000), 31-49.

- Gordon, B, Parker, T, Levine, D, *et al.* Neutralization of endotoxin by a phospholipid emulsion in healthy volunteers. *J. Infect. Dis.* 191 (2005), 1515-1522.
- Gupta, H, Dai, L, Datta, G, *et al.* Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses by an Apolipoprotein AI Mimetic Peptide. *Circ. Res.* 97 (2005), 236-243.
- Hager, D, Burgess, R. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal Biochem.* 109 (1980), 76-86.
- Hancock, R, Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8 (2000), 402-410.
- Hirata, M, Zhong, J, Wright, S, *et al.* Structure and functions of endotoxin-binding peptides derived from CAP18. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392 (1995), 317-326.
- Hristova, K, Selsted, M, White, S. Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *J Biol Chem.* 272 (1997), 24224-24233.
- Kitchens, R, Thompson, P. Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins. *Journal of Endotoxin Research* 9 (2003), 113-118.
- Larrick, J, Hirata, M, Balint, R, *et al.* Human CAP18: A novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 63 (1995), 1291-1297.
- Lehrer, R, Barton, A, Daher, K, *et al.* Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 84 (1989), 553-561.
- Lehrer, R, Lichtenstein, A, Ganz, T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11 (1993), 105-128.

- Levine, D, Parker, T, Donnelly, T, *et al.* In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 (1993), 12040 -12044.
- Levy, O. A neutrophil-derived anti-infective molecule: bactericidal/permeability-increasing protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000), 2925-2931.
- Levy, O, Elsbach, P. Bactericidal/permeability-increasing protein in host defense and its efficacy in the treatment of bacterial sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 3 (2001), 407-412.
- Lowry, O, Rosebrough, N, Farr, A, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 (1951), 265-275.
- Ma, J, Liao, X, Lou, B, *et al.* Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Biochim. Biophys. Acta Sin (Shanghai).* 36 (2004), 419-424.
- Marra, M, Thornton, M, Snable, J, *et al.* Endotoxin-binding and -neutralizing properties of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein and monoclonal antibodies HA-1A and E5. *Crit Care Med* 22 (1994), 559-565.
- Marra, M, Wilde, C, Griffith, J, *et al.* Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *J Immunol* 144 (1990), 662-666.
- Nizet, V, Ohtake, T, Lauth, X, *et al.* Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414 (2001), 454-457.
- Ohhashi, T, Moritani, C, Andoh, H, *et al.* Preparative high-yield electroelution of proteins after separation by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and its application to analysis of amino acid sequences and to raise antibodies. *J Chromatogr.* 585 (1991), 153-159.
- Okuda, D, Yomogida, S, Tamura, H, *et al.* Determination of the antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing regions of guinea pig

neutrophil cathelicidin peptide CAP11. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006), 2602-2607.

-Ooi, C, Weiss, J, Doerfler, M, *et al.* Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kDa N-terminal fragment and a newly isolated 30 kDa C-terminal fragment of the 55-60 kDa bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *J Exp Med* 174 (1991), 649-655.

-Parker, T, Levine, D, Chang, J, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infection and Immunity.* 63 (1995), 253-258.

-Risso, A. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 68 (2000), 785-792.

-Sawyer, J, Martin, N, Hancock, R. Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 56 (1988), 693-698.

-Siegel, J. Antiendotoxin antibodies. *Ann. Inter. Med.* 122 (1995), 315-316.

-Storm, D, Rosenthal, K. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* 46 (1977), 723-763.

-Thomas, C, Surolia, N, Surolia, A. Kinetic and thermodynamic analysis of the interactions of 23-residue peptides with endotoxin. *J Biol Chem.* 276 (2001), 35701-35706.

-Tricerri, A, Córscico, B, Toledo, J, *et al.* Conformation of Apolipoprotein A-I in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol. *Biochem et Biophys Acta* 1391 (1998), 67-78.

-Trubetskoy, V, Koshkina, N, Omel'yanenko, V, *et al.* FITC-labeled lipopolysaccharide: use as a probe for liposomal membrane incorporation studies. *FEBS Lett.* 269 (1990), 79-82.

-Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56 (1992), 395-411.

- von der Mohlen, M, Kimmings, A, Wedel, N, *et al.* Inhibition of endotoxin-induced cytokine release and neutrophil activation in humans by use of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein. *J Infect Dis* 172 (1995), 144-151.
- Wang, W, Smith, D, Moulding, K, *et al.* The dependence of membrane permeability by the antibacterial peptide cecropin B and its analogs, CB-1 and CB-3, on liposomes of different composition. *J Biol Chem.* 273 (1998), 27438-27448.
- Wiese, A, Gutschmann, T, Seydel, U. Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes. *Innate Immunity* 9 (2003), 67-84.
- Wurfel, M, Wright, S. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers. *The Journal of immunology.* 158 (1997), 3925-3934.
- Zhang, G, Mann, D, Tsai, C. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrin-derived peptide. *Infect Immun.* 67 (1999), 1353-1358.
- Ziegler, E, McCutchan, J, Fierer, J, *et al.* Treatment of Gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 307 (1982), 1225-1230.

Capítulo VII: Discusión General y Conclusiones.

Capítulo VII: Discusión General y Conclusiones.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) o endotoxina, es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Pertenece al grupo de estimuladores más potentes del sistema inmune y juega un rol importante en la patogénesis y manifestación de las infecciones por bacterias gram negativas, en general, y del shock séptico, en particular (Bone, 1991), jugando un rol central en la iniciación y perpetuación de la inflamación sistémica.

El LPS juega un rol dual en la patogénesis actuando como barrera contra los antibióticos al formar parte de la pared externa de las bacterias y como molécula efectora que activa el sistema inmune cuando se libera a circulación como consecuencia de la división celular, la muerte bacteriana o por tratamiento con antibióticos (Ginsburg, 2002).

El LPS en suspensión forma oligómeros que son reconocidos por las células de la inmunidad innata como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) (Ulevitch, 1999).

La porción lípido A del LPS representa dicho patrón molecular asociado a patógenos (Cohen, 2002). El proceso de reconocimiento involucra la unión del LPS a proteínas del suero, como LBP, (Tobias, 1986) seguida por la unión del complejo a proteínas unidas a membrana (CD14 y TLR-4). Estas interacciones inician la cascada de señalización intracelular que da lugar a la activación de las células de la inmunidad innata ((Poltorak, 1998). Esta activación es caracterizada por la inducción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, así como la potenciación de la actividad fagocítica de células del sistema inmune (Zhang, 1999).

La producción controlada y la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias son eventos esenciales para el desarrollo de la inflamación local, pero en casos extremos, cuando la bacteria alcanza la

circulación sanguínea, tiene lugar una activación no controlada de los fagocitos que resulta en una secreción masiva de citoquinas. Estas citoquinas son mediadores en el desarrollo de sepsis severa, seguida por daño sistémico y en algunos casos, muerte. El rol del LPS tanto en la resistencia bacteriana como en la patogénesis del shock séptico enfatiza la importancia de aumentar el entendimiento de las propiedades de la interacción entre el LPS y las moléculas que lo unen.

Se ha encontrado en estudios realizados *in vitro* que las lipoproteínas unen LPS y neutralizan los efectos tóxicos del mismo, siendo las HDL la principal lipoproteína con dicha función (Brandenburg, 2002), (van Leeuwen, 2001), (Wu, 2004).

Wu *et al.* (Wu, 2004) reportaron que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) poseen propiedades antiinflamatorias y juegan un rol crucial en la inmunidad innata, regulando la respuesta inflamatoria así como disminuyendo la severidad del daño tisular durante el shock séptico, vía unión y neutralización del LPS.

En cuanto al componente de las HDL responsable del efecto neutralizante, en la literatura existe gran controversia; mientras que algunos autores postulan que la apolipoproteína AI (componente proteico mayoritario) es el principal componente de las HDL que une y neutraliza LPS (Massamiri, 1997), (Park, 1996), otros autores están a favor que la porción lipídica es el componente que tiene un rol fundamental en este proceso (Parker, 1995), (Levine, 1993).

En los años recientes ha sido reportado que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) no son solo secuestrantes de LPS sino que también ejercen efectos inmunomodulatorios *in vivo*, los cuales median, al menos en parte, los efectos beneficiosos de las HDL reportados en modelos animales de sepsis, shock hemorrágico, daño isquémico entre otros (Cockerill, 2001), (Cuzzocrea, 2004), (McDonald, 2003), (Thiemermann, 2003). Estos descubrimientos forman las bases para la hipótesis de trabajo de esta tesis, que plantea que las HDL pueden resultar efectivas

como un nuevo enfoque terapéutico para el manejo de patologías humanas caracterizadas por inflamación sistémica o localizada.

El objetivo principal de este trabajo de tesis es aportar conocimientos para el entendimiento del mecanismo de neutralización del LPS por HDL, caracterizando desde el punto de vista biofísico y biológico la interacción de LPS con membranas lipídicas (simulando la matriz lipídica de las HDL) y con apo AI (componente proteico mayoritario de las HDL).

Como primera aproximación al estudio de la interacción del LPS con apo AI, en el capítulo III se estudió el efecto del LPS sobre el proceso de micelización, parámetro funcional de la proteína. A partir de los resultados obtenidos, pudimos concluir que la presencia de LPS es un factor más que modifica la cinética del proceso de micelización de MLV-DMPC por acción de la apo AI (Fig. III.2). También se observó que el LPS posee la capacidad de micelizar liposomas de DMPC (Fig. III.3). Al caracterizar las partículas formadas durante la micelización se observó que en presencia de LPS sólo se forman complejos que poseen 2 moléculas de apo AI/partícula (Fig. III.4). Estos resultados, conjuntamente, indicarían que el LPS tiene la capacidad de extraer lípidos de los liposomas de MLV-DMPC, disminuyendo así la relación lípido:apo AI, pudiendo explicar parcialmente la disminución en la eficiencia del proceso y la formación de un solo tipo de complejo micelar, ya que el proceso de micelización depende de la relación lípido:proteína. Las medidas de fluorescencia intrínseca de apo AI en presencia de LPS muestran un entorno de los Trp en promedio más polar respecto a la proteína en buffer y una importante disminución en la intensidad de fluorescencia de apo AI (Fig. III.5). Estas observaciones pueden ser explicadas si ocurre algún cambio conformacional en la proteína que genere un apagamiento de la fluorescencia de los residuos Trp por residuos vecinos en la proteína. Finalmente se determinó que la presencia del LPS, a la concentración utilizada, si bien no modifica la temperatura de transición de los MLV-DMPC, podría estar

alterando alguna propiedad de la membrana, tal como se observa por la disminución en la amplitud de la transición de fase (Fig. III.6). Los cambios en las propiedades de membrana podrían estar influenciando en la eficiencia del proceso de micelización.

A partir de estos resultados se abren dos líneas de estudio: 1) la caracterización de la interacción del LPS con membranas y 2) la caracterización de la interacción de la endotoxina con la apo A1, con la finalidad de determinar el componente de las HDLs responsable de la neutralización del efecto endotóxico.

En el capítulo IV se estudió específicamente la interacción del LPS con sistemas modelos de membrana. En una primera parte, se estudió la capacidad del LPS presente en medio acuoso de intercalarse en las membranas con el objeto de discutir si matrices lipídicas pueden tener un rol en la neutralización del efecto endotóxico del LPS. Para esto se emplearon técnicas biofísicas para detectar la intercalación de moléculas de endotoxina en membranas de liposomas.

Los resultados obtenidos indican que el LPS se asocia a las membranas lipídicas compuestas de fosfolípidos neutros, desplazando el valor de Potencial Zeta a valores más negativos (Fig. IV.3A.1). La interacción observada no es una mera absorción superficial sino, como lo demuestran los experimentos de FRET, el LPS se intercala, como monómero, entre los fosfolípidos (Fig. IV.3A.3). Se observó también que la intercalación del LPS en las membranas es dependiente de su composición ya que la presencia de PS o colesterol en la bicapa disminuye la intercalación (Fig. IV.3A.4). A partir de los resultados obtenidos con FITC-LPS surge la hipótesis de que los liposomas podrían desplazar el equilibrio agregado \rightarrow monómero (Fig. IV.3A.5).

En una segunda parte del capítulo IV se caracterizó la formación de dominios inducidos por LPS en membranas, determinando sus propiedades de fase a través de técnicas de microscopía de fluorescencia de dos-fotones empleando GUVs como sistema modelo de membrana y Laurdan como sonda.

Se determinó que a la temperatura de crecimiento de las GUVs (60°C), donde los lípidos se encuentran por encima de su temperatura de transición de fase (T_t), el LPS se distribuye homogéneamente en la bicapa (Fig. IV.3B.1), en contraste con la distribución de la endotoxina observada a 25°C, temperatura a la que se observa localización preferencial de las moléculas de LPS en áreas específicas de las GUVs, identificadas como regiones ordenadas (alto valor de GP). Estas áreas están enriquecidas en DPPC, lípido que a 25°C se encuentra por debajo de su T_t (Fig. IV.3B.2).

Finalmente, se analizó si el LPS incorporado en la membrana otorga resistencia a la solubilización frente a detergentes, comportamiento comparable al conferido por el colesterol.

Los experimentos de solubilización muestran claramente que tanto el LPS como el colesterol confieren a los liposomas resistencia a la solubilización por Tritón X-100 (Fig. IV.3C.1).

Estos resultados apoyan la hipótesis formulada por Allende y McIntosh (Allende, 2003) que sugiere un rol del LPS en la membrana bacteriana equivalente al que cumple el colesterol en la membrana plasmática de las células eucarióticas.

Sin embargo, analizando dichos dominios por microscopía de 2 fotones se observó que la forma de los mismos para la mezcla que contienen LPS es similar a la forma de los dominios para la mezcla binaria DOPC/DPPC y ambos son diferentes a lo observado para la mezcla que contiene colesterol (Fig. VI.3C.2). Las medidas de GP del Laurdan muestran que la influencia del LPS y del colesterol en el empaquetamiento de los lípidos es diferente.

Dentro de este contexto, en este trabajo de tesis se propone que el LPS de *E. coli* puede formar dominios en las membranas de células eucariotas y que dichos dominios si bien pueden diferir en su naturaleza pueden estar desempeñando un rol similar a los dominios que contienen colesterol, organizando un complejo de múltiples receptores involucrados en las vías de transducción de señales de la respuesta

inmune, como fue propuesto para el LPS del patógeno intracelular *B. abortus*, luego de su procesamiento lisosomal (Forestier, 2000).

La segunda línea de investigación dentro de este trabajo de tesis, está relacionada al estudio de la interacción entre la apo AI y el LPS.

La apo AI posee estructura de α -hélice anfipática y es posible que los sitios de unión a lípidos en dichas hélices sean los dominios de unión a la porción lípido A del LPS, pudiendo tras la unión, neutralizar la toxicidad del mismo. De esta forma, la apo AI podría ser utilizada como un tratamiento efectivo para prevenir y revertir las consecuencias de la endotoxemia.

El entendimiento del proceso de neutralización del LPS mediado por apo AI requiere conocimiento sobre la conformación de apo AI libre de lípidos y las transiciones moleculares que ocurren en la proteína al unir LPS.

En el capítulo V de este trabajo de tesis se realizaron estudios estructurales de la apo AI libre e incubada con LPS y los resultados obtenidos sugieren que la interacción de la apo AI con el LPS no involucra la porción N-terminal de la proteína, donde están localizados los residuos Trp, determinado por ensayos de oxidación con NBS (Fig. V.5) y por experimentos de FRET entre ANS y Trp (Fig. V.7).

A partir de los ensayos de desnaturalización realizados, encontramos que el complejo apo AI-LPS tiene un comportamiento correspondiente a un estado del tipo glóbulo fundido, definido por la menor cooperatividad observada en el proceso de desnaturalización (Fig. V.8). Como consecuencia de la interacción con el LPS, la apo AI es menos estable, demostrado por un menor valor de $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ y en presencia de LPS el proceso de desnaturalización es más favorable termodinámicamente (Fig. V.9). A su vez la interacción entre ambas moléculas promueve un incremento en la superficie hidrofóbica accesible al ANS (Fig. V.6).

La pérdida de conformación en la proteína fue confirmada por ensayos de proteólisis limitada con Tripsina, donde se observó que la

interacción de la apo AI con LPS, genera en la proteína, la exposición de regiones susceptibles al clivaje, que en la estructura nativa de la apo AI se encuentran ocultas (Fig. V.10).

Los espectros de dicroísmo circular demuestran que la presencia de LPS no modifica el tipo de estructura secundaria predominante en la apo AI, pero disminuye el contenido de α -hélice de la proteína (Fig. V.11). Estos datos sugieren que en presencia de LPS hay desplegamiento de porciones α -hélice en alguna región de la proteína, generando una pérdida de conformación.

La estabilidad de la apo AI en solución está mediada por interacciones intramoleculares entre las porciones N-t y C-t de la proteína. Probablemente la región C-terminal esté involucrada en la interacción con el LPS ya que la proteína al interactuar con el LPS pierde estabilidad en solución.

La interacción directa entre apo AI y LPS se verificó por ensayos de *cross-linking* utilizando ^{125}I -ASD-LPS (Fig. V.12) y proteólisis con CNBr (Fig. V.14). Los resultados muestran que el LPS no se une a una única región de la apo AI; los datos obtenidos permitieron identificar que la región de la apo AI comprendida entre los aa 148-243 (porción C-terminal), corresponde a una región con alta afinidad de unión al LPS, lo que se deduce de la mayor radiactividad asociada a esta banda.

La porción N-t de apo AI (aa 1-139) es altamente helicoidal y es responsable de la estabilidad de la proteína en solución mientras que la porción C-t (aa 140-243) es relativamente inestable. Roberts et al (Roberts, 1997), estudiaron la proteólisis limitada de la apo AI libre de lípidos y encontraron que la región C-t es altamente susceptible a la proteólisis, mientras que la porción N-t está menos expuesta. De los análisis de los patrones de clivaje generados se propuso un modelo de la apo AI libre de lípidos, que consiste en un ramillete de α -hélices en la región N-t con una porción C-t desorganizada.

Detalles de la conformación e interacción con lípidos del fragmento C-t de 46-residuos (aa 198-243), conteniendo las hélices 9 y

10, fueron publicados por Zhu y Atkinson (Zhu, 2007). Los espectros de dicroísmo circular muestran que el péptido (198-243) de apo AI está desplegado en solución acuosa, pero por auto-asociación se induce aproximadamente un 50% de α hélice, proponiendo que este péptido puede imitar la interacción con fosfolípidos de la apo AI.

Segrest *et al* (Segrest, 1994) propusieron que las α -hélices de las apolipoproteínas no son equivalentes en cuanto a su afinidad por lípidos. La diferencia en afinidad no parece estar relacionada exclusivamente con su momento hidrofóbico sino también con la distribución de residuos cargados a lo largo del eje de la hélice. Las hélices anfipáticas se clasifican en 7 clases (A, H, L, G, K, C y M) basado en un análisis detallado de sus propiedades estructurales y fisicoquímicas. La hélice que más frecuentemente se encuentra en las apolipoproteínas intercambiables son las hélices clase A, caracterizadas por un grupo de residuos cargados positivamente en la interface polar-no polar y residuos cargados negativamente en el centro de la cara polar. Se identificaron 6 hélices clase A en la apo AI (Segrest, 1992), (Frank, 2000) hélices 44–65, 66–87 y 121–142 en la mitad N-t y las hélices 143–164, 166–186, y 187–208 en la mitad C-t de la apo AI. Además, otros dos tipos de hélices, identificadas como clase G* (hélice 8–33) y clase Y (hélices 88–98 y 99–120 en la mitad N-t y hélices 209–219 y 220–241 en la mitad C-t de apo AI) fueron halladas en la estructura de la apo AI. La característica de las hélices Y consiste en 2 grupos de residuos negativos sobre la cara polar, separando dos brazos y con la base de la hélice clase Y formada por 3 grupos de residuos cargados positivamente.

Segrest propuso también que la afinidad por lípidos se correlaciona con la cantidad de hélices pertenecientes a la clase A. (Segrest, 1992), (Segrest, 1990).

Sin embargo, la mitad C-terminal posee un grado mucho menor de elementos de estructura secundaria. Los segmentos 143-187 y 187-243 parecen contener cada uno un segmento helicoidal (Davidson, 1996) correspondientes a las hélices 7 y 10 [(Segrest, 1999).

Es interesante observar que un péptido sintético conteniendo la secuencia 220–241 de la apo AI tiene la mayor afinidad por lípidos entre las otras hélices de la proteína. Palgunachari *et al.* mostró que entre los péptidos sintéticos ensayados aquel cuya secuencia correspondía a 220-242 tenía la mayor afinidad por lípidos. (Palgunachari, 1996).

Mientras que importantes funciones han sido asignadas a la región C-terminal de la apo AI en cuanto a la afinidad por lípidos (Ji, 1995) y a la interacción con células (Morrison, 1991) no se conocía su rol en la interacción con LPS. Nuestros resultados muestran que la apo AI, libre de lípidos y en ausencia de LBP, puede interactuar con LPS, y son las regiones helicoidales a lo largo de la proteína responsables de las múltiples interacciones con LPS como se observa en la figura V.14, por la gran cantidad de fragmentos marcados radiactivamente sin embargo, es la mitad C-terminal la que contiene el mayor grado de marca.

Por otro lado, Ma (Ma, 2004) propuso que existen al menos dos clases de sitios de unión de LPS: uno formado por las hélices anfipáticas de la apo AI que median la unión directa al LPS y otro que participa en la unión de LBP, y por lo tanto une de manera indirecta al LPS. Estos autores postulan que las HDL no pueden unir LPS de manera directa ya que los dominios que participan en la unión a lípidos, y por lo tanto median la unión de LPS, están comprometidos en la unión a lípidos de la matriz de las HDL, de allí que en este caso se necesite la participación de LBP.

Sin embargo, de acuerdo a los datos del capítulo IV acerca de la partición de LPS en membranas, de los resultados de este trabajo de tesis se sugiere que cuando la proteína está asociada a lípidos en las HDLs, la partición de LPS en la matriz lipídica de las lipoproteínas favorece la interacción entre los dominios de unión a lípido de la apo AI, los que están expuestos a la matriz lipídica de las HDL, y el LPS.

Otra posibilidad surge de resultados obtenidos utilizando el reactivo fotoactivable 3-(trifluoromethyl)-3-(*m*-[125I]iodophenyl)-diazirine, los cuales mostraron las regiones de la apo AI en contacto con

los lípidos en las HDLr. Dos regiones están laxamente unidas: el dominio C-terminal y un dominio central localizado entre los residuos 87-112. Ambos dominios se clasifican como hélices de clase Y (Córsico, 2001).

Estos resultados, así como los que surgen de este trabajo de tesis muestran el rol fundamental de la mitad C-t de la apo AI en la unión de LPS, ya sea en su forma libre como en su forma asociada a lípidos en las HDL.

Dado que el desarrollo de terapias adecuadas contra el shock séptico sigue siendo un desafío, dentro del marco de los objetivos planteados en este trabajo de tesis, se decidió evaluar la capacidad neutralizante de la toxicidad del LPS de la apo AI, del fragmento F (porción C-t) y de liposomas.

Los resultados de los experimentos realizados en el capítulo VI demostraron que liposomas neutros en solución, la apo AI y el fragmento F obtenido por proteólisis con CNBr (correspondiente a los aa 148-243), poseen la capacidad de neutralizar la toxicidad del LPS, observado por una disminución en los niveles de TNF- α liberados por las células RAW al ser estimuladas.

Como surge de los resultados, tanto la apo AI como el fragmento F poseen un efecto inhibitorio similar sobre la producción de citoquinas, lo cual sugiere que la capacidad neutralizante de la apo AI debe provenir de su porción C-t.

El principal objetivo planteado para este trabajo de tesis fue determinar la porción de las HDL involucrada en la neutralización del LPS. En base a los resultados obtenidos, la apo AI es capaz de neutralizar el efecto endotóxico del LPS. En el caso de apo AI libre de lípidos, ésta une directamente el LPS porque sus sitios de unión a lípidos están expuestos y disponibles para interactuar con el LPS. En el caso de apo AI asociada a lípidos formando HDL, si tenemos en cuenta que las matrices lipídicas (como los liposomas) también son capaces de neutralizar la endotoxicidad del LPS, podemos postular que las HDL unen LPS en su matriz lipídica, donde los dominios de unión a lípidos de la proteína

están involucrados en la interacción con los componentes lipídicos de las HDLs. Sin embargo, la unión de LPS puede ser indirecta vía LBP, para la cual la apo AI contiene dominios específicos de unión, o vía la región C-t, la cual se encuentra laxamente unida en las HDL, y por lo tanto, disponible para la unión de LPS. Por lo tanto, se concluye que la región C-terminal mediaría la unión del LPS tanto a las HDL como a la apo AI libre de lípidos.

Por lo tanto concluimos que la apo AI es el componente de las HDL que protege contra el LPS, a través de interacción directa, y la partición del LPS en la matriz lipídica de las HDL favorece esta interacción.

Sin embargo, debido a que el tratamiento ante el shock séptico con HDL o apo AI resulta impracticable por las cantidades de partículas/proteína requeridas (Gupta, 2005), durante los últimos 10 años se han ensayado un gran número de opciones terapéuticas contra el shock séptico basadas en el empleo de proteínas y péptidos que naturalmente unen LPS. Si bien los resultados obtenidos *in vitro* han sido exitosos en muchos casos, hasta el momento el balance entre la cantidad terapéutica necesaria para neutralizar el efecto endotóxico y la toxicidad *in vivo* no rinde una ecuación satisfactoria. Esta es pues la razón por la cual las perspectivas futuras están enfocadas en el desarrollo de péptidos derivados de la apo AI que tengan una eficiencia incrementada en la unión del LPS, con una alta eficiencia en la eliminación de la endotoxina de circulación.

En base a lo conocido para proteínas y péptidos que unen y neutralizan la toxicidad del LPS, es proyección de este trabajo de tesis utilizar el fragmento F de apo AI y péptidos derivados de este fragmento con el objetivo final de bajo un diseño racional, desarrollar futuras terapias eficaces contra el shock séptico.

VII.1- Bibliografía.

- Allende, D, McIntosh, T. Lipopolysaccharides in Bacterial Membranes Act like Cholesterol in Eukaryotic Plasma Membranes in Providing Protection against Melittin-Induced Bilayer Lysis. *Biochemistry*. 42 (2003), 1101-1108.
- Bone, R. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Inter. Med.* 115 (1991), 457-469.
- Brandenburg, K, Jurgens, G, Andra, J, *et al.* Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002), 5972-5981.
- Cockerill, G, McDonald, M, Mota-Filipe, H, *et al.* High density lipoproteins reduce organ injury and organ dysfunction in a rat model of hemorrhagic shock. *FASEB J* 15 (2001), 1941-1952.
- Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420 (2002), 885-891.
- Córsico, B, Toledo, J, Garda, H. Evidence for a central apolipoprotein AI domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), 16978-16985.
- Cuzzocrea, S, Dugo, L, Patel, N, *et al.* High-density lipoproteins reduce the intestinal damage associated with ischemia/reperfusion and colitis. *Shock* 21 (2004), 342-351.
- Davidson, W, Hazlett, T, Mantulin, W, *et al.* The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), 13605-13610.
- Forestier, C, Deleuil, F, Lapaque, N, *et al.* *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J. Immunol.* 165 (2000), 5202-5210.
- Frank, P, Marcel, Y. Apolipoprotein AI: structure-function relationship. *J. Lipid Res* 41 (2000), 853-872.

- Ginsburg, I. The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS* 110 (2002), 753–770.
- Gupta, H, Dai, L, Datta, G, *et al.* Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses by an Apolipoprotein AI Mimetic Peptide. *Circ. Res.* 97 (2005), 236-243.
- Ji, Y, Jonas, A. Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), 11290-11297.
- Levine, D, Parker, T, Donnelly, T, *et al.* In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 (1993), 12040 -12044.
- Ma, J, Liao, X, Lou, B, *et al.* Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Biochim. Biophys. Acta Sin (Shanghai).* 36 (2004), 419-424.
- Massamiri, T, Tobias, P, Curtiss, L. Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein A-I. *J. Lipid. Res.* 38 (1997), 516-525.
- McDonald, M, Dhady, P, Cockerill, G, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* 20 (2003), 551-557.
- Morrison, J, Fidge, N, Tozuka, M. Determination of the structural domain of apo AI recognized by high density lipoprotein receptors. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 18780-18785.
- Palgunachari, M, Mishra, V, Lund-Katz, S, *et al.* Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo AI have significant lipid affinity. Implications for HDL assembly. *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 16 (1996), 328–338.
- Park, C, Wright, S. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 18054-18060.

- Parker, T, Levine, D, Chang, J, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolisaccharides in human whole blood. *Infection and Immunity*. 63 (1995), 253-258.
- Poltorak, A, He, X, Smirnova, I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science* 282 (1998), 2085–2088.
- Roberts, LM, Ray, MJ, Shih, TW, *et al.* Structural Analysis of Apolipoprotein A-I: Limited Proteolysis of Methionine-Reduced and -Oxidized Lipid-Free and Lipid-Bound Human Apo A-I *Biochemistry* 36 (1997), 7615-7624.
- Segrest, J, De Loof, H, Dohlman, J, *et al.* Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins* 8 (1990), 103–117
- Segrest, J, Garber, D, Brouillette, C, *et al.* The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv Protein Chem* 45 (1994), 303–369.
- Segrest, J, Jones, M, De Loof, H, *et al.* The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 33 (1992), 141-166.
- Segrest, J, Jones, M, Klou, A, *et al.* A detailed molecular belt model for apolipoprotein AI in discoidal high density lipoprotein. *J. Biol Chem* 274 (1999), 31755- 31758.
- Thiemermann, C, Patel, N, Kvale, E, *et al.* High density lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003), 1833-1843.
- Tobias, P, Soldau, K, Ulevitch, R. Isolation of a lipopolysaccharide binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164 (1986), 785-793.
- Ulevitch, R, Tobias, P. Recognition of gram negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr.Opin. Immunol.* 11 (1999), 19–22.
- van Leeuwen, H, van Beek, A, Dalliga-Thie, G, *et al.* The role of high density lipoprotein in sepsis. *The Netherlands Journal of Medicine.* 59 (2001), 102-110.

-Wu, A, Hinds, C, Thiemermann, C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 21 (2004), 210-221.

-Zhang, F, Kirschning, C, Mancinelli, R, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), 7611–7614.

-Zhu, H, Atkinson, D. Conformation and lipid binding of a C-terminal (198-243) peptide of human apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 46 (2007), 1624-1634.