

CAPÍTULO II:

HIPÓTESIS CENTRAL Y OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO

Hipótesis central y objetivos generales del trabajo

Como se mencionó en la introducción, experimentos previos de este laboratorio con reactivos fotoactivables (Corsico et al., 2001) mostraron que la región del par de hélices Y centrales de apoA-I es la única que se inserta profundamente en la membrana de vesículas lipídicas, ya sea cuando estas vesículas son enfrentadas con apoA-I libre de lípidos o con apoA-I en la forma de complejos lipoproteicos discoidales (rHDL). En las rHDL, sin embargo, esta región tiene relativamente poco contacto o interacción con los lípidos. Este hecho, más la analogía predicha con ectatomin (una toxina hidrosoluble que se inserta en membranas para formar un canal iónico), nos indujo a proponer la hipótesis de que estas hélices centrales podrían comportarse como un dominio estructural y funcionalmente independiente del resto de la molécula de apoA-I que mediaría la unión de las HDL discoidales a membranas y facilitaría el intercambio de colesterol.

El análisis de las dos hélices Y centrales de apoA-I (separadas por el residuo de prolina 99) indica que sus caras hidrofóbicas son bastante más angostas que las caras hidrofílicas (ver Figura II-1). Esto permite predecir que la interacción entre las caras hidrofóbicas de estas hélices sería suficiente para que los residuos no polares queden excluidos del entorno acuoso cuando estas hélices quedan separadas de los lípidos en las HDL discoidales (Fig II-1 A). Así, es razonable asumir la hipótesis de que en las HDL discoidales, estas hélices puedan encontrarse en equilibrio entre una forma débilmente unida a los lípidos y una forma "despegada" de los mismos, lo que explicaría su relativamente baja accesibilidad a reactivos fotoactivables incorporados en los discos (Corsico et al., 2001).

Para insertarse en membranas, al menos dos modos serían posibles (ver fig.II-2): El primer modo de inserción posible sería la penetración de un ramillete de hélices con su eje mayor paralelo a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (fig. II- 2). Este modo es muy improbable de ocurrir sólo con las dos hélices Y del dominio central ya que por el ancho de las caras hidrofílicas sería imposible excluir a todos los residuos polares del contacto con el entorno hidrofóbico del interior de la membrana. Sin embargo, esto sería en principio posible con un ramillete de al menos 4 hélices como ocurre en el caso de ectatomin y muchas proteínas que forman canales en membranas. ApoA-I forma dímeros y mayores oligómeros en solución acuosa dependiendo de la concentración, pero su estructura cuaternaria en el estado unido a membrana es desconocido. En las HDL discoidales, un ramillete de 4 hélices Y centrales sería posible si estas se encontraran

cercanas entre sí como lo indican algunas evidencias (Tricerri et al., 2001),(Davidson and Hilliard, 2003).

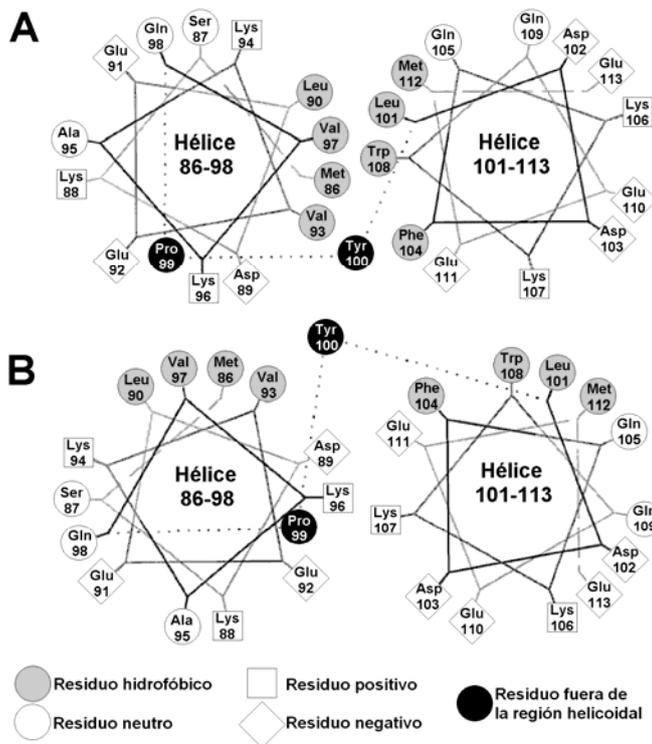


Fig.II-1: Probable configuración de las hélices Y centrales de apoAI en las HDL discoidales libres (A) y en HDL discoidales ancladas a membranas (B).

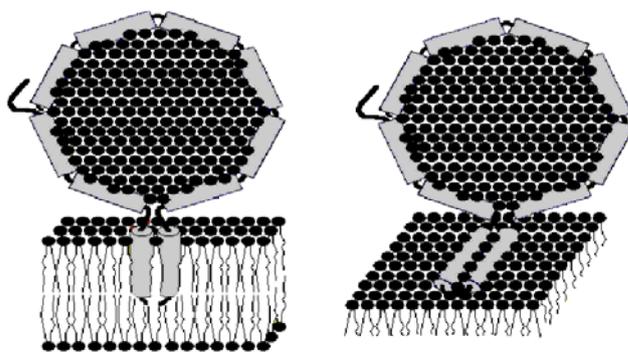


Fig. II-2: Dos modos probables de inserción del dominio central de apoAI en membranas. Aquí se muestra a apoA-I como formando parte de HDL discoidales

B) El segundo modo de inserción posible es la interacción de las hélices Y centrales con su eje mayor paralelo a la superficie de la membrana insertando la cara hidrofóbica entre los lípidos (Fig II-2). Esta es la manera que se ha propuesto para la disposición de todas las hélices anfipáticas de apoA-I y otras apolipoproteínas intercambiables en la superficie de lipoproteínas esféricas (Segrest et al., 1992) por lo que se supone sería el modo preferible de interacción para la mayoría de las hélices de apoA-I cuando esta interactúan con una membrana. Sin embargo, el hecho de que sólo las hélices Y centrales sean marcadas por el reactivo ¹²⁵I-TID/PC indica que éstas se insertan a mayor

profundidad, o que de alguna manera se diferencian en su conformación quedando mucho más accesibles al reactivo que el resto de las hélices. Este modo requeriría que respecto al estado libre, cada hélice gire unos 90° en sentido contrario a la otra para permitir la inserción en la membrana (Fig. II-1 B).

El primer objetivo de este trabajo de tesis fue ensayar la hipótesis de la independencia estructural y funcional del dominio central con un péptido sintético con la secuencia de apoA-I entre los residuos 77 y 120 (AI 77-120). Para ello nos propusimos estudiar: a) la capacidad de AI 77-120 para interactuar con vesículas lipídicas e insertarse en membranas fosfolipídicas artificiales, b) la estructura secundaria y cuaternaria de AI 77-120 en los estados libre y unido a membrana, y c) la actividad de este péptido comparativamente con apoA-I para desorber colesterol de membranas y catalizar su intercambio entre vesículas.

El segundo objetivo planteado fue utilizar resonancia electrónica paramagnética (EPR) para estudiar la influencia de la apoA-I y eventualmente del péptido AI 77-120 sobre la movilidad de sondas paramagnéticas localizadas a diferentes profundidades de la membrana de vesículas fosfolipídicas, y en la bicapa de HDL discoidales. Como la interacción de muchas proteínas anfitrópicas con la membrana resulta en un cambio en el ordenamiento y la movilidad de los lípidos de la membrana que depende del modo de inserción, esto podría aportar información útil sobre el modo de inserción.

El tercer objetivo del presente trabajo fue utilizar mutantes de apoA-I con un único residuo de triptofano en diferentes posiciones estratégicas del par de hélices Y central para obtener información sobre: a) la conformación de esta región de la proteína en los estados libre, unida a membrana o formando parte de HDL discoidales reconstituidas; y b) el modo y la topología de inserción de esta región de apoA-I en la membrana tratando de distinguir entre los dos modos anteriores.