

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS

Rol e independencia funcional de las hélices Y centrales de Apo A-I en la interacción con membranas. Estudios con un péptido sintético

Parte A: Rol e independencia funcional de las hélices Y centrales de apo A-I en la interacción con membranas. Estudios con un péptido sintético

Para ensayar la hipótesis de que las hélices Y centrales de apoA-I se comportan como un dominio estructural y funcionalmente independiente del resto de la molécula de la proteína, se trabajó con un péptido sintético con la secuencia de apoA-I comprendida entre los residuos 77 y 120 (AI 77-120). Esta secuencia se extiende entre la última parte de la hélice 2 (tipo A) y a las hélices 3 y 4 (tipo Y) completas que fueron predichas y encontradas en la estructura cristalina de Δ 1-43 apoA-I, o al loop que separa las hélices B-C y la primera parte de la hélice C en la estructura cristalina de apoA-I completa (ver Fig I-9, I-10 y I-11 en Introducción). La racionalidad de extender hacia ambos lados la región que se marca con el reactivo fotoactivable (87-112) se basó en abarcar al menos toda la región homóloga con ectatomin de manera de aumentar la probabilidad de que el péptido adquiriera un cierto grado de estructuración en agua, hecho que no es muy frecuente en péptidos cortos. Se investigó la capacidad de AI 77-120 para interactuar con vesículas lipídicas e insertarse en membranas fosfolipídicas artificiales, y su estructura secundaria y cuaternaria en los estados libre y unido a membrana. En colaboración con otro integrante del grupo (Dr. J. D. Toledo) también se comparó la actividad de este péptido con la de apoA-I completa para desorber colesterol de membranas y catalizar su intercambio entre vesículas.

Afinidad de AI77-120 por membranas fosfolipídicas

La apoA-I, ya sea cuando está libre de lípidos (Yokoyama et al., 1980) ó en la forma de rHDL (Tricerri et al., 1998) posee una mayor afinidad o selectividad por membranas y/o vesículas que poseen colesterol respecto a aquellas que no lo poseen. Para determinar si el péptido AI 77-120 mantiene esta propiedad, se midió su afinidad por vesículas de POPC y de POPC/colesterol (4:1 relación molar). Vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) fueron obtenidas por sonicación de MLV en un sonicador de punta, usando pulsos de 4 seg. Luego de incubar 3.5 nmol de AI77-120 con cantidades crecientes de SUV de POPC ó POPC/Colesterol (4/1 relación molar) por 5 min a temperatura ambiente, la mezcla fue ultrafiltrada a través de filtros Microcon 50. La concentración del péptido libre en el ultrafiltrado se determinó por la fluorescencia de triptofano (λ excitación 280 nm, λ emisión 340 nm). Alternativamente,

0,2 ml del filtrado fueron inyectados en la misma columna de HPLC de fase reversa usada en la purificación de AI 77-120 (ver Materiales y Métodos) y la concentración del péptido se determinó del área del pico obtenido por detección de absorbancia a 280 nm. En ambos casos se usó una solución de concentración conocida de AI 77-120 como referencia.

Los datos obtenidos se muestran en la figura IV-1. Los mismos fueron interpretados asumiendo un modelo simple con sitios de unión independientes y no interactuantes. Con este modelo, la cantidad de péptido libre sigue la siguiente ecuación:

$$Pf = \frac{(Pt - Kd \cdot PC/n) \pm \sqrt{(PC/n)^2 + 2PC(Kd - Pt)/n + (Kd + Pt)^2}}{2} \quad (\text{ecuación 1})$$

en donde **Pt** es la cantidad de péptido total, **Pf** es la cantidad de péptido libre, **Kd** es la constante de disociación, **PC** es la cantidad total de vesículas en concentración de fosfatidilcolina y **n** el número de moléculas de fosfatidilcolina que conforman un sitio de unión.

Los resultados indican que AI 77-120 se comporta similarmente a apoA-I en cuanto a que presenta selectividad o preferencia por vesículas fosfolipídicas que contienen colesterol. Los valores de Kd obtenidos para AI 77-120, sin embargo, son un orden de magnitud menor que los obtenidos por Yokoyama y col. (Yokoyama et al., 1980) para la unión de apoA-I libre a vesículas de PC de huevo, o por Tricerri y col. (Tricerri et al., 2002) a vesículas de POPC; aunque son del mismo orden que los obtenidos por estos últimos autores para el caso de complejos lipoproteicos discoidales reconstituidos con apoA-I. El número de moléculas de PC que conforman un sitio de unión para AI 77-120 es alrededor de 50 en el caso de POPC pura y alrededor de 32 en el caso de vesículas de POPC/Col (4/1 en mol). Estos valores son también alrededor de uno a dos órdenes de magnitud menores que los reportados por esos autores para la apoA-I completa, mientras que un valor intermedio fue reportado por Tricerri para complejos lipoproteicos discoidales.

Los parámetros obtenidos sugieren que el modo de unión a vesículas de AI 77-120 sería similar a apoA-I cuando ésta se encuentra en complejos discoidales, con sólo las hélices centrales participando en dicha unión ya que las otras estarían comprometidas en la unión a los lípidos del disco. El mayor tamaño de los complejos discoidales en relación al péptido AI 77-120 puede explicar que en el primer caso se requiera un mayor número de moléculas de PC para conformar un sitio de unión. En el

caso de la apoA-I libre de lípidos, todas la hélices anfipáticas participan en la unión a las vesículas por tanto contribuyen a su mayor afinidad, aunque como se mencionó, sólo la región central se inserta profundamente en la membrana de manera de ser marcada por el reactivo ^{125}I -TID/PC (Corsico et al., 2001). Con todas las hélices anfipáticas interactuando con la superficie de la membrana, es esperable que en este caso el número de moléculas de PC que conforman un sitio de unión para apoA-I sea aún mayor que para los complejos discoidales.

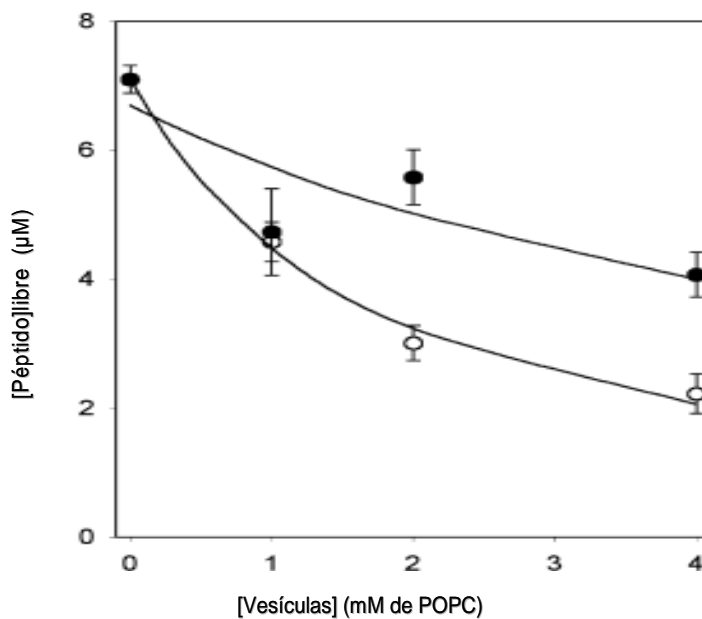


Fig. IV-1: Unión del péptido AI 77-120 a vesículas unilamelares de POPC (negro) y de POPC/Colesterol (en blanco). Se muestran la media y desvío estándar de tres determinaciones independientes. Las líneas son los mejores ajustes de la ecuación 1 a los datos experimentales, de los que se obtuvieron los siguientes parámetros: $K_d = 122 \pm 40 \mu\text{M}$ y $n = 47 \pm 14$ moléculas de PC por sitio de unión con las vesículas de POPC; y $K_d = 49 \pm 3 \mu\text{M}$ y $n = 32 \pm 2$ moléculas de PC por sitio de unión con las vesículas de POPC/colesterol.

Marcación por reactivos fotoactivables

Con el fin de conocer si AI 77-120 se inserta profundamente en la bicapa de las vesículas fosfolipídicas como lo hace la región central de apoA-I, se estudió en comparación con ésta la capacidad de ser foto marcado por el análogo fosfolipídico ^{125}I -TID-PC (ver Introducción) incorporado en vesículas fosfolipídicas. El grupo reactivo de este compuesto (diazirina) se localiza bien en el interior de la bicapa lipídica. Cuando es activado por exposición a luz ultravioleta genera un carbeno muy reactivo que se entrecruza covalentemente con todos los grupos químicos que se encuentran en la cercanía, y podrá así marcar con ^{125}I a las regiones de la proteína o al péptido que se inserten profundamente en la membrana. Para este ensayo se prepararon vesículas unilamelares de POPC/Col (en relación molar 4/1), incluyendo el reactivo fotoactivable 1-O-hexadecanoil-2-O-(9[[2-[^{125}I]iodo-4-(trifluorometil-3H-diazirina-3-il) benzil] oxil] carbonil] nonanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina ($^{125}\text{TID-PC/16}$) (1 mCi/nmol de POPC). Estas vesículas (25 nmol de POPC) fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto con AI77-120 ó apoA-I (2 nmol) en 0,1 ml de buffer Tris-HCl 10 mM, 0,15 M NaCl pH 8,0 y se fotoactivaron por 30 segundos con una lámpara de Xenón. Se extrajeron los lípidos con cloroformo/metanol (2:1) y la fracción acuosa se trató con acetona a -20°C , para precipitar a AI77120 ó apoA-I. La radiactividad del precipitado se contó en un contador gamma.

Muestra	Radiactividad en el precipitado con acetona(cpm/nmol de proteína)
apoA-I	15.380
AI 77-120	42.069

Se puede observar que en estas condiciones, AI 77-120 es fotomarcado con una mayor eficiencia que apoA-I. La relación de concentración proteína (o péptido) a vesículas usada en este ensayo es mucho mayor que las usadas en los ensayos de unión por lo que las condiciones son más cercanas a saturación. Así, aunque la afinidad es menor para AI 77-120 que para apoA-I, su mayor eficiencia de marcado se debería al mayor número de sitios de unión.

Cambios estructurales de AI 77-120 en la interacción con membranas: estudios de estructura secundaria por dicroísmo circular

El dicroísmo circular permite estudiar la estructura secundaria proteica, mediante el análisis de su espectro de absorción en el UV lejano, cuando la muestra es iluminada con luz circularmente polarizada. Mediante el análisis de dicho espectro en comparación con el de proteínas cuya estructura es conocida, distintos programas predicen el porcentaje de aminoácidos organizados en forma de hélice α , hoja β ó estructura desorganizada (Leroy et al., 1993)

De este modo se puede asimismo, estimar el cambio conformacional asociado a la interacción de proteínas con membranas. Para tal fin, se determinó el espectro del péptido (a una concentración 15 μ M), a 28 °C en una celda de 1 cm de paso, en un espectrómetro Jasco Modelo 715

La figura IV-2 muestra los espectros de AI 77-120 en solución acuosa y en 50% de trifluoroetanol. Usando el programa Varselec (Toumadje et al., 1992), se estima que AI 77-120 tiene un 23% de α -hélice en solución acuosa. Esto significa un grado de estructuración relativamente alto considerando el pequeño tamaño del péptido (44 residuos), y el hecho de que la molécula completa de apoA-I (243 residuos) en agua tiene alrededor de 56% de α -hélice. En trifluoroetanol, el contenido de hélice se incrementa a un 64%, indicando que AI 77-120 es capaz de adquirir un mayor contenido de α hélice en función del medio (Leroy et al., 1993)

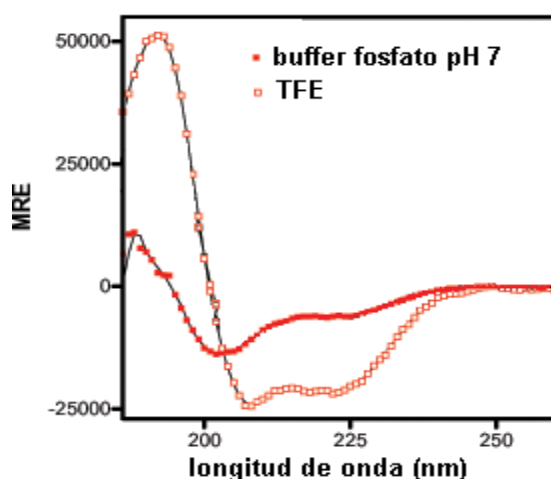


Fig. IV-2: Espectros de dicroísmo circular de AI77-120 en 5mM fosfato de sodio pH 7,0 y 50% de trifluoroetanol (TFE). De los mismos se obtuvo un contenido de α -hélice de 23 y 64% en buffer acuoso y TFE, respectivamente.

El contenido de α -hélice de la apoA-I completa se incrementa cuando esta se une a lípidos, al menos cuando se encuentra en forma de complejos discoidales reconstituidos (Tricerri et al., 2002). Esto, así como también hecho de que el contenido de α -hélice del péptido sea dependiente del medio, nos indujo a estudiar la posibilidad de que la estructura secundaria pueda ser modificada cuando AI 77-120 se une a vesículas lipídicas. Para ello, los espectros de dicroísmo circular se midieron con cantidades crecientes de vesículas unilamelares de POPC/Col (4:1) (fig. IV-3). Al incrementar la concentración de vesículas, la calidad de los espectros es notoriamente deteriorada en especial a menores longitudes de onda debido al aumento en la luz dispersada y al ruido introducido al restar los espectros de las vesículas. Por esta razón, además de la relativamente baja afinidad del péptido por las vesículas, no es posible medir en condiciones en que un alto porcentaje del péptido se encuentre unido a las vesículas. Sin embargo, estos experimentos indican que no hay cambios detectables en el espectro de CD cuando se agregan hasta 1.8 mg/ml de vesículas de POPC/colesterol (4/1 en moles). Usando los parámetros que se obtuvieron de los datos de la figura 11, puede estimarse que en estas condiciones al menos 35-40% de AI 77-120 se encontraría unida a las vesículas. Así, puede concluirse que la unión de AI 77-120 a las vesículas ocurre sin grandes cambios en la estructura secundaria.

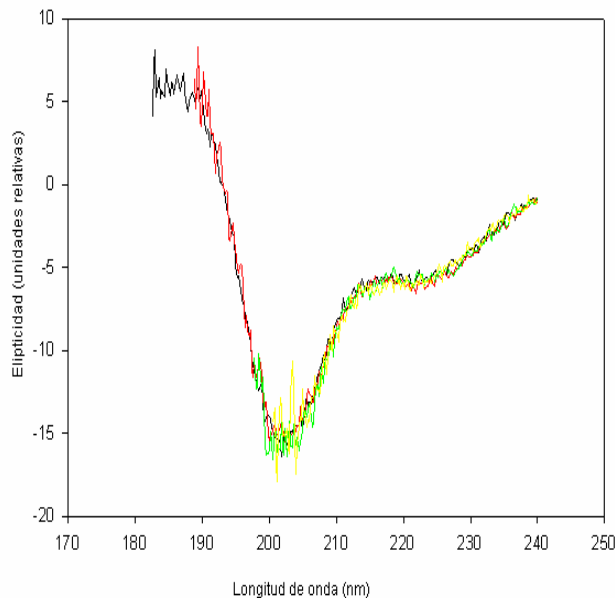


Fig. IV-3: Efecto de vesículas lipídicas sobre la estructura secundaria del péptido AI 77-120. Espectros de CD de AI 77-120 (30 μ M) con cero (línea negra), 0,6 (línea roja), 1,2 (línea verde), y 1,8 (línea amarilla) mg/ml de vesículas unilamelares de POPC/colesterol (4/1 en mol)- respectivamente

Estudios de estructura oligomérica usando agentes entrecruzantes (crosslinkers)

Para muchas proteínas anfitrópicas, el mecanismo de interacción con la membrana depende de una modificación en su estructura cuaternaria. Es bien conocido que apoA-I en solución acuosa presenta un equilibrio entre la forma de monómero y de oligómeros de distinto número de agregación dependiendo de la concentración (McGuire et al., 1996). También es bien conocido que para formar complejos lipoproteicos discoidales se requiere de al menos una estructura dimérica, pero no existen datos disponibles sobre el estado oligomérico de apoA-I en el estado unido a membrana. Para estudiar los posibles cambios en la estructura oligomérica de apoA-I y AI 77-120 cuando se unen a vesículas fosfolipídicas, se usó un reactivo entrecruzante (crosslinker) capaz de unir covalentemente a los monómeros cercanos entre sí: Bis-sulfosuccinimidil suberato (BS³). Este reactivo divalente forma enlaces covalentes con aminas primarias, como los grupos amino de las proteínas, de manera de unir de manera irreversible los residuos de proteína que se encuentran dentro de una distancia de 8 átomos de carbono (McGuire et al., 1996).

ApoA-I y AI 77-120 (50 µg) se trataron con BS³ en buffer fosfato sódico 25mM pH 7,8; en ausencia y en presencia (2 mg) de vesículas de POPC/Col (relación molar 4/1) en un volumen final de 0,15 ml. En ausencia de vesículas, la relación molar entre reactivo y proteína o péptido es de 150/1, y en el caso de la reacción con vesículas dicha relación fue de 1500/1. Al cabo de tres horas a temperatura ambiente, las muestras se analizaron por SDS-PAGE en geles en gradiente (4 a 16%) con buffer tris-glicina (en el caso de apoA-I), y geles al 16,5% con buffer tris-tricina (para AI 77-120).

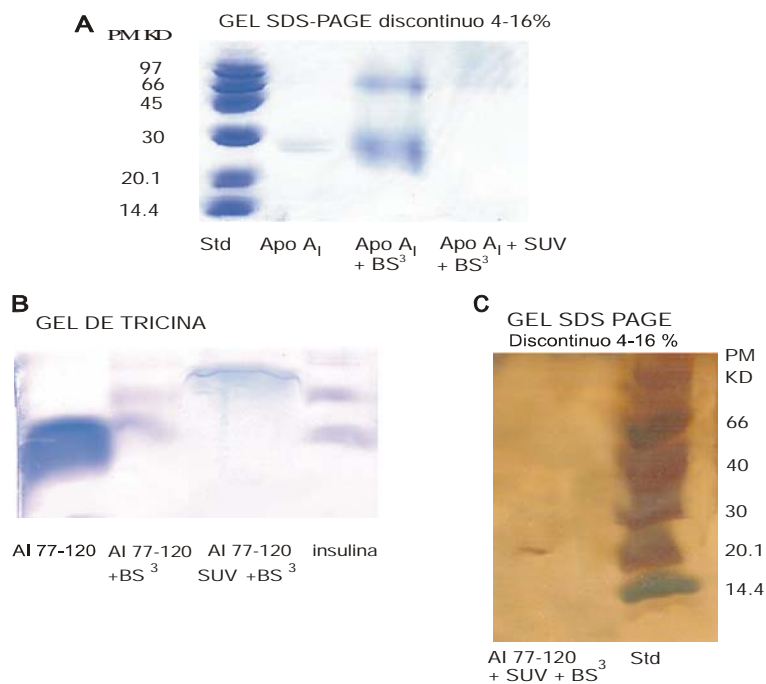


Fig. IV-4: Geles de SDS-PAGE con buffer glicina (A y C) y con buffer Tricina (B), en donde se muestran las formación de oligómeros en presencia y ausencia de vesículas

El entrecruzamiento por BS3 de apoA-I en solución acuosa (tercera calle de figura IV-4 A) indica que en la concentración ensayada, aproximadamente 2/3 de monómeros están en equilibrio con 1/3 de dímeros. La adición de vesículas de POPC/colesterol (4/1) modifica esta distribución de modo que el monómero ya no se observa, el dímero llega a ser la especie predominante y también se observan oligómeros mayores (trímeros y tetrámeros) en menores proporciones (Figura IV-4 A, calle 4).

La figura IV-4 B muestra los resultados del entrecruzamiento del péptido AI 77-120 con el reactivo BS3. En solución acuosa y a la concentración ensayada (0.33 mg/ml), el monómero (aproximadamente 60 %) es la especie más abundante (segunda calle, en comparación con un estándar de insulina en la calle 4), seguida por el dímero (aproximadamente 30%) y menores proporciones de oligómeros mayores. Similarmente a lo ocurrido con apoA-I, el agregado de vesículas fosfolipídicas resulta en la desaparición de la forma monomérica (tercera calle de Fig IV-4 B). El gel de poliacrilamida 16,5% con buffer tris-tricina mostrado en la figura IV-4 B es adecuado para separar péptidos pequeños, pero no permite distinguir bien si la forma más abundante de AI 77-120 en presencia de vesículas es trimérica o tetramérica. Para distinguir entre estas dos posibilidades, esta muestra también fue corrida en un gel en gradiente (4-16%) con buffer tris-glicina (Fig IV-4 C). En el mismo se observa

claramente que la banda principal tiene una masa aparente de 20 kD, que se corresponde con la forma tetramérica de AI 77-120.

Así, estos resultados indican que tanto apoA-I como AI 77-120 presentan una mayor tendencia a oligomerizar cuando se encuentran unidos a membrana en comparación a cuando están en solución acuosa.

Capacidad de AI 77-120 para formar complejos lipoproteicos

A) Mediante micelización a la temperatura de transición del lípido (Swaney and Chang, 1980)

Aunque apoA-I se une a vesículas de fosfolípidos zwitteriónicos en el estado líquido cristalino como POPC sin producir su disrupción, la interacción con vesículas de esta clase de lípidos en el rango de temperatura de la transición de fase gel/líquido-cristalino (como DMPC a 24°C) resulta en la rápida disrupción de las vesículas y la generación de HDL discoidales. Esta reacción de micelización es muy fácil de seguir por la disminución de turbidez. Se investigó la capacidad de AI 77-120 comparativamente con apoA-I para micelizar liposomas multilamelares de DMPC a 24°C midiendo el cambio de densidad óptica a 350 nm. En la figura IV-5 se muestra que la reacción fue positiva para apoA-I pero completamente ineficiente para AI 77-120.

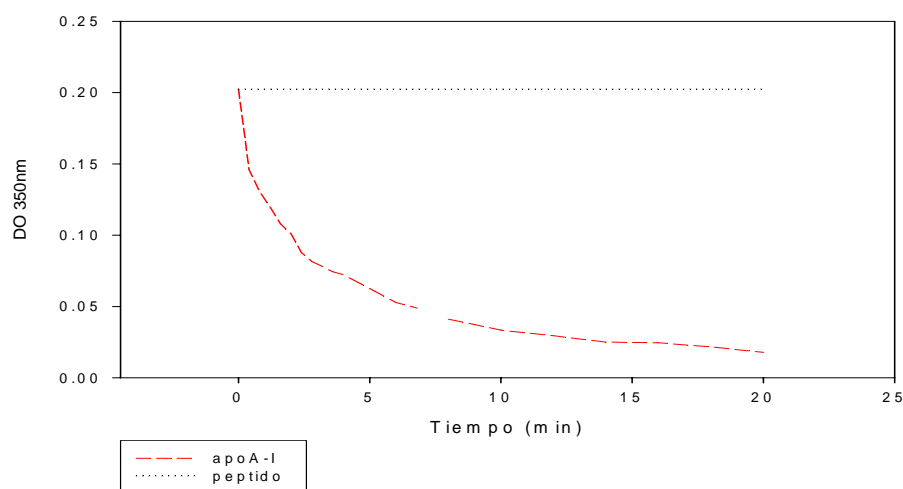


Fig.IV-5: Velocidad de micelización a temperatura de transición de fase de DMPC (24°C) en presencia de apoA-I en rojo y del AI 77-120 en negro.

B) Mediante el uso del detergente colato de sodio

Complejos HDL discoidales de apoA-I con fosfolípidos también pueden ser obtenidos mediante la formación de micelas mixtas con el detergente colato de sodio, y la posterior eliminación del detergente por diálisis. Este método es muy utilizado para reconstituir HDL discoidales con fosfolípidos insaturados como POPC que presentan la transición de fase por debajo de 0°C (Matz and Jonas, 1982b),(Jonas et al., 1989). Se investigó la posibilidad de que AI 77-120 pudiera formar complejos lipoproteicos por este método. Para esto, se usaron membranas de diálisis de corte de 3.5 kD, a diferencia de las normalmente utilizadas con apoA-I (de 10 kD). En la figura IV-6 se muestra el análisis por PAGE nativo en gradiente 4-24% de los productos generados de esta manera por AI 77-120. Se observa claramente la generación de un complejo de alrededor de 70 kD.

Estos resultados indican que aunque AI 77-120 no reacciona espontáneamente con vesículas fosfolipídicas a la temperatura de transición, es capaz de formar complejos con lípidos con la ayuda de detergentes. Estos, sin embargo, son de bastante menor tamaño que las rHDL discoidales generadas por apoA-I (de al menos 100 kD)

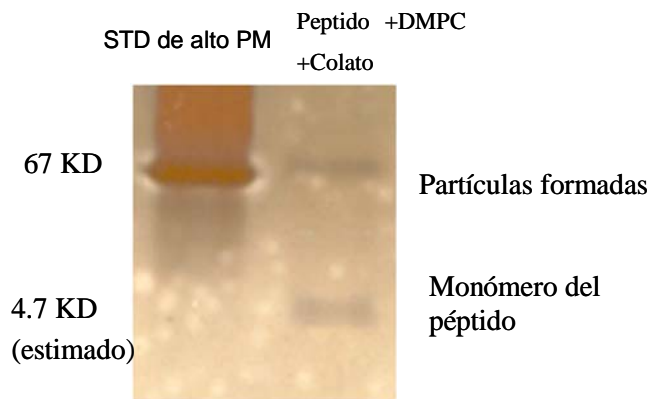


Fig.IV-6: Gel nativo en gradiente de 4-24% en donde se observan partículas formadas por diálisis con colato del péptido AI 77-120 y DMPC

Independencia funcional de AI 77-120. Catálisis de la transferencia de colesterol o su análogo dehidroergosterol entre vesículas fosfolipídicas

Una propiedad de la apoA-I de gran relevancia para su rol en el transporte reverso de colesterol es su capacidad de facilitar la desorción de colesterol de membranas, catalizando así su transferencia a aceptores como lipoproteínas (Toledo et al., 2000) o vesículas lipídicas (Letizia and Phillips, 1991). Con el objeto de determinar si esta actividad de apoA-I es dependiente de la región central, se comparó la actividad de AI 77-120 con la de apoA-I completa para catalizar la transferencia de un análogo fluorescente de colesterol (dehidroergosterol, DHE) o colesterol radio marcado entre vesículas fosfolipídicas.

Transferencia de dehidroergosterol entre vesículas

El DHE tiene la propiedad de que su fluorescencia está autoextinguida si se encuentra en altas concentraciones en vesículas fosfolipídicas. Esto permite seguir la cinética de su transferencia a vesículas aceptoras por el incremento en la fluorescencia producido por la consecuente dilución. Se prepararon vesículas donoras con POPC y ergosta-5,7,9(11), 22-tetraen-3b-ol (dehidroergosterol, DHE) en relación molar 4/1. Las vesículas aceptoras se prepararon con 100% de POPC. Vesículas donoras (4 mM en POPC) se mezclaron con las aceptoras (100 mM en POPC) en ausencia o presencia de 5 mM de AI 77-120 o de apoA-I en 2,5 ml de buffer Tris-HCl 10 mM, 150 mM de NaCl pH 7.4 a 30°C. La reacción se siguió por el incremento en la fluorescencia (excitación 320 nm y emisión a 394 nm, con 16 nm de ancho de banda en excitación y 8 nm en emisión) medida en un espectrofluorómetro SLM4800 con cubetas de 1 cm de paso óptico. Las velocidades iniciales de incremento de fluorescencia se muestran en la Figura IV-7

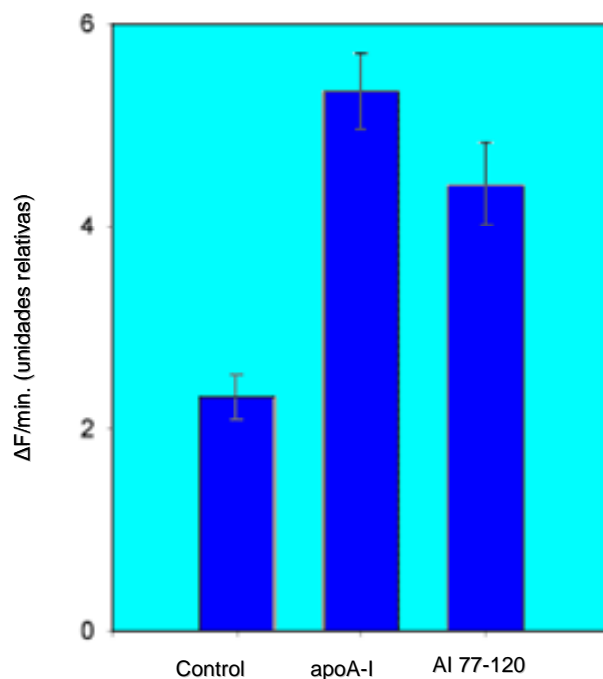


Fig IV-7: Actividad de AI 77-120 y de apoA-I para catalizar la transferencia de DHE entre vesículas: Vesículas donoras de (POPC/DHE 4:1 mol/mol) y aceptoras (100% en POPC) son mezcladas como se indica más arriba. Las barras indican el incremento de fluorescencia inicial ($\Delta F/\text{minuto}$) de la dilución de DHE en ausencia (control) y en presencia de 5 μM apoA-I o AI 77-120.

Estos datos indican que el péptido AI77-120 retiene casi completamente la actividad de apoA-I para catalizar la transferencia del DHE entre vesículas.

Transferencia de ^3H -colesterol desde vesículas de carga negativa a vesículas neutras

Una segunda estrategia para evaluar comparativamente con apoA-I la actividad de AI 77-120 de catalizar la transferencia de colesterol entre vesículas fue la reportada por Letizia y Phillips (Letizia and Phillips, 1991) que se basa en medir la cantidad de colesterol radiomarcado transferido entre vesículas donoras y aceptoras de diferente carga para permitir su separación.

Las vesículas donoras (cargadas negativamente) se prepararon con una composición de 10 % de colesterol, 75% POPC y 15 % dicetil fosfato, conteniendo 2 mCi ^3H -Col/mg de lípidos totales. Las vesículas aceptoras (neutras) tenían una composición de 10 % colesterol, 90 % POPC, y conteniendo ^{14}C -trioleina (0.05 mCi/mg de lípido) como un trazador no intercambiable. Las incubaciones se realizaron

en fosfato de sodio 20 mM, pH 6 (buffer A) a 37 °C, con una concentración de vesículas aceptoras diez veces en exceso con respecto a las donoras (concentración total = 0.45 mg/ml), para que la etapa limitante sea la desorción del colesterol de éstas últimas, y minimizando así el flujo inverso. Alícuotas del medio de reacción fueron tomadas a diferentes tiempos y fraccionadas por intercambio iónico. Para esto, se prepararon pequeñas columnas de 1 ml de capacidad con DEAE Sepharose CL-6B, equilibradas con buffer A y saturadas con vesículas sonicadas (unilamelares pequeñas) de PC de huevo para reducir adsorción inespecífica. Una alícuota de 0.25 ml de la mezcla de reacción es cargada en la columna y eluída con 1 ml de buffer A. El eluato es recogido y contado por centelleo líquido discriminando entre ^3H y ^{14}C . La posibilidad de que apoA-I o AI 77-120 produzcan interrupción de las vesículas de carga negativa y/o generación de complejos lipoproteicos fue descartada por mediciones de turbidez (light scattering) y análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes.

La fracción de ^3H -Col transferido a las vesículas aceptoras se calculó de acuerdo a Letizia y Phillips (Letizia and Phillips, 1991) después de corregir por la recuperación de las vesículas aceptoras (obtenidas de las cuentas de ^{14}C), y por la fracción de vesículas donoras que eluye de la columna (obtenida de la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ a tiempo cero). Los datos de la fracción transferida al aceptor (**X**) en función del tiempo (**t**) obtenidos se analizaron por regresión no lineal con la siguiente ecuación:

$$\mathbf{X} = \mathbf{Xm} (1 - e^{-\mathbf{k}t}) \quad (\text{ecuación 2})$$

El ajuste de esta ecuación a los datos experimentales permitió calcular la constante de transferencia de pseudo primer orden (**k**) y la máxima fracción transferida a $t = \infty$ (**Xm**). Como el valor de **Xm** siempre estuvo comprendido entre 0,4 y 0,5; el mismo se fijó en 0,455 para aumentar la precisión en el cálculo de **k**. Este valor fue asumido considerando que las vesículas aceptoras se encuentran diez veces más concentradas que las donoras, y que sólo el colesterol de la hemicapa externa (un 50%) es transferido.

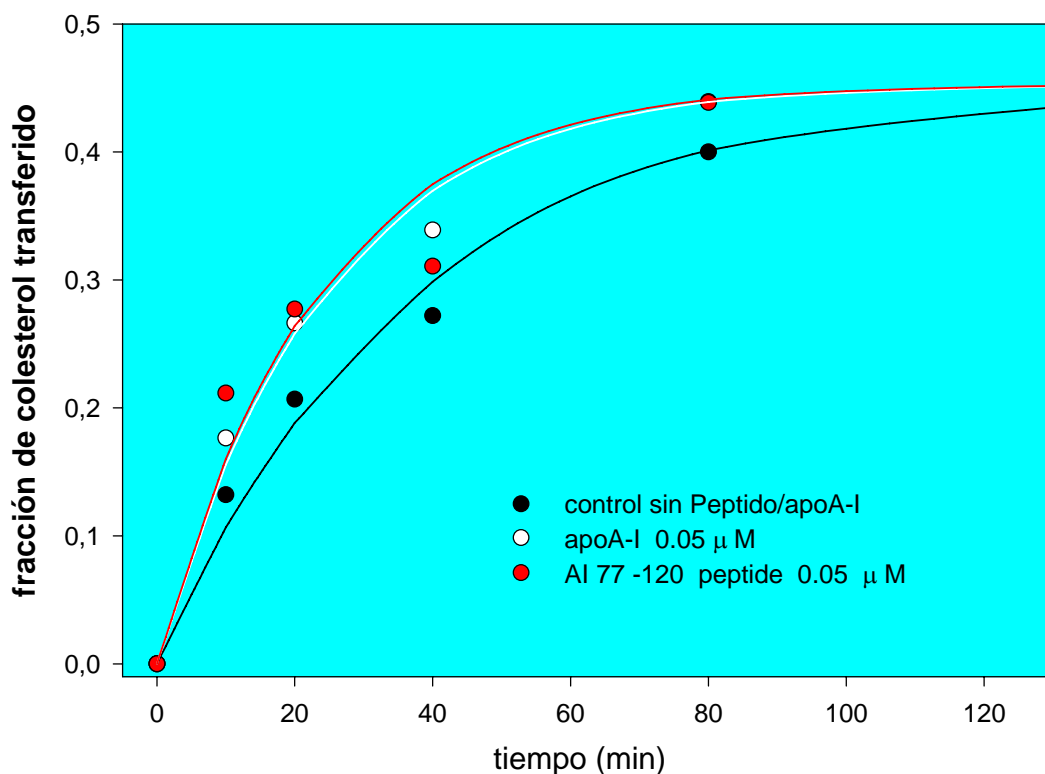


Fig. IV-8: Influencia de apoA-I y de AI 77-120 sobre la velocidad de desorción de colesterol desde vesículas de carga negativa y su transferencia a vesículas neutras. Las líneas los mejores ajustes de la ecuación 2 a los datos.

La figura IV-816 muestra que similarmente a apoA-I, el péptido AI 77-120 incrementa la velocidad de transferencia de colesterol entre estas vesículas. La relación exponencial simple asumida (ecuación 2) se ajusta bien a los datos obtenidos. Se realizaron mediciones con diferentes concentraciones de AI 77-120 o apoA-I. Los valores de la constante de velocidad k obtenidos de los ajustes son graficados en la figura IV-9, que indica una dependencia hiperbólica.

Como fue bien discutido por Letizia y Phillips (Letizia and Phillips, 1991), con este exceso de vesículas aceptoras la etapa limitante es la desorción del colesterol de la bicapa de las vesículas donoras. Así, estos resultados muestran que AI 77-120 tiene una actividad similar a la apoA-I completa para facilitar la desorción de colesterol de membranas y sugieren que el dominio central de apoA-I sería responsable de esta propiedad.

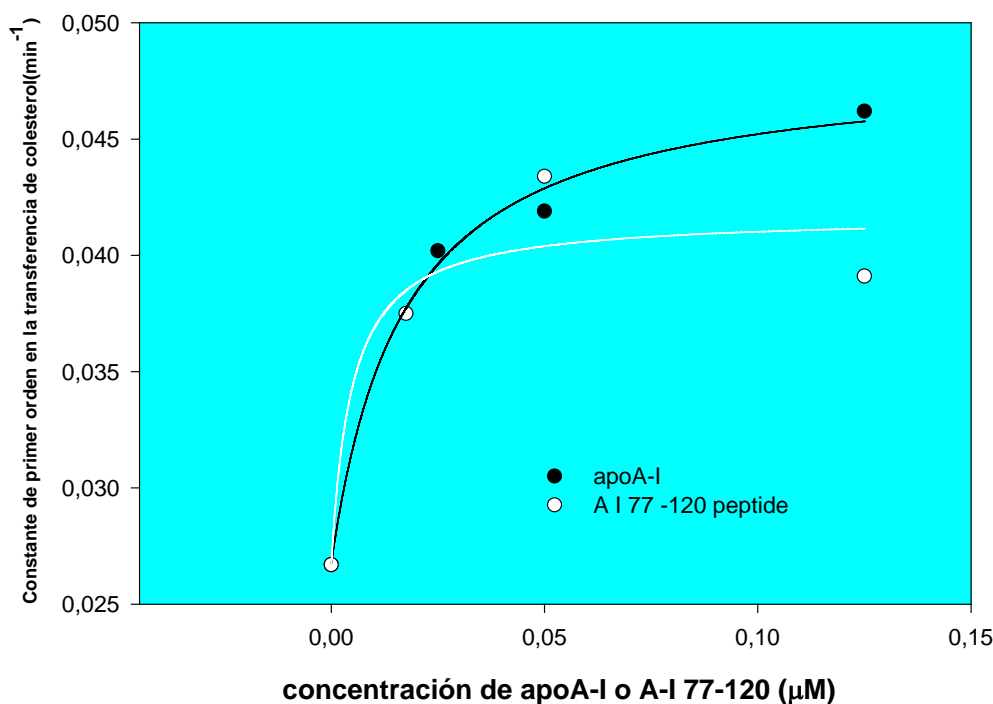


Fig.IV-9: Dependencia de la concentración sobre la transferencia de colesterol activada por apoA-I o AI77-120

Conclusiones parciales

Los resultados de los experimentos descritos en esta parte del trabajo soportan la hipótesis de que la región de apoA-I que incluye al par de hélices Y 3-4 constituye un dominio estructural y funcionalmente independiente del resto de la proteína. Esta región aislada (en el péptido AI 77-120) es capaz de mantener varias de las propiedades que presenta la proteína completa como: a) interactuar preferentemente con membranas que contienen colesterol, b) insertarse profundamente en la bicapa lipídica, y c) promover la desorción de colesterol de membranas y facilitar su transferencia a vesículas aceptoras.

AI 77-120 presenta un contenido de α -hélice considerable para un péptido de su tamaño, el que no parece modificarse en la interacción con la membrana. Sin embargo, la inserción en la membrana va acompañada de oligomerización. Este hecho, que también se demostró aquí que ocurre con apoA-I completa, es de gran importancia para considerar el mecanismo de inserción del dominio central en la membrana. La oligomerización de AI 77-120 en la membrana podría permitir la formación de un ramillete de hélices intermolecular (como en ectatomin) que se inserten en la bicapa

lipídica con el eje mayor de las hélices perpendicular a la superficie de la membrana. El hecho de que también se observe para apoA-I una mayor eficiencia de oligomerización cuando unida a vesículas, nos permitió expandir la hipótesis y postular que el dominio de inserción activo podría ser un ramillete intermolecular formado por dos pares de hélices Y centrales.

Es claro y esperable que no todas las propiedades de apoA-I dependan de su región central y puedan ser reproducidas por AI 77-120. Entre las que no pueden ser reproducidas, se determinó aquí la incapacidad de AI 77-120 para generar espontáneamente complejos lipoproteicos por su interacción con vesículas de DMPC a la temperatura de transición. Esto podría deberse a pequeño tamaño o a su relativamente baja afinidad por membranas que carecen de colesterol. Al respecto, es de notar que otros fragmentos de apoA-I como aquel conteniendo al par de hélices Y del extremo C presentan una afinidad por lípidos mucho mayor y producen la disrupción de vesículas de DMPC a la temperatura de transición (Palgunachari et al., 1996). Aunque incapaz de micelizar vesículas de DMPC, AI 77-120 puede formar complejos con lípidos de unos 70 kDa por diálisis de micelas mixtas con detergentes.

El par de hélices Y centrales aisladas parecen ser bastante estable en solución acuosa, como lo indica el hecho de que AI 77-120 sea mayoritariamente monomérica en concentraciones tan altas como 0,33 mg/ml. o 66 μ M (como para apoA-I la misma concentración en peso es unas 6 veces menor en moles, es claro que ésta tiene una mayor tendencia a oligomerizar en solución acuosa que AI 77-120). Ya que un factor importante que favorece la tendencia a oligomerizar es la exposición al entorno acuoso de regiones (patches) hidrofóbicas, la relativamente alta estabilidad de AI 77-120 en forma monomérica podría ser explicada por el mayor ancho de las caras hidrofílicas respecto a las hidrofóbicas que presentan estas hélices (ver Sección Objetivos). Esto permitiría la interacción de estas dos hélices por sus caras hidrofóbicas resulte en la casi nula exposición de residuos hidrofóbicos al entorno acuoso.

Estudios de Resonancia de Electrónica Paramagnética

Estudios de Resonancia de Electrónica Paramagnética

Estos estudios tuvieron la finalidad de determinar cómo es modificada la movilidad y orden de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos a diferentes profundidades de la bicapa lipídica cuando la apoA-I o el péptido AI 77-120 interaccionan con membranas, y cómo se ven afectadas las diferentes regiones de una bicapa lipídica que forma parte de complejos discoidales con la apoA-I. El parámetro utilizado para cuantificar la movilidad es el denominado parámetro de orden (ver Métodos), que no está relacionado con la velocidad de movimiento sino con la restricción de las posibles orientaciones que pueda adquirir la sonda paramagnética. Cuanto mayor es el parámetro de orden, menor es el ángulo cónico dentro del que está restringida la movilidad de la sonda.

Influencia de la unión de apoA-I y AI 77-120 a vesículas fosfolipídicas sobre la movilidad de los lípidos de la membrana

Se realizaron estudios utilizando como modelos de membranas vesículas unilamelares de POPC o POPC/Col, con la cantidad adecuada de marcador de espin (ver métodos). El motivo de utilizar estos dos tipos de membrana es que, si bien tanto la apoA-I como el péptido se unen con cierta afinidad a membranas de POPC pura, ambos interactúan con mayor afinidad a bicapas que contienen colesterol. Se trabajó a una relación molar lípido/proteína de 15/1 (en la que las vesículas se encontrarían saturadas con apoA-I o AI 77-120), y a diferentes temperaturas obteniéndose los siguientes resultados con los diferentes marcadores de espin. A continuación se muestran los espectros de EPR realizados obtenidos con vesículas de POPC/Colesterol

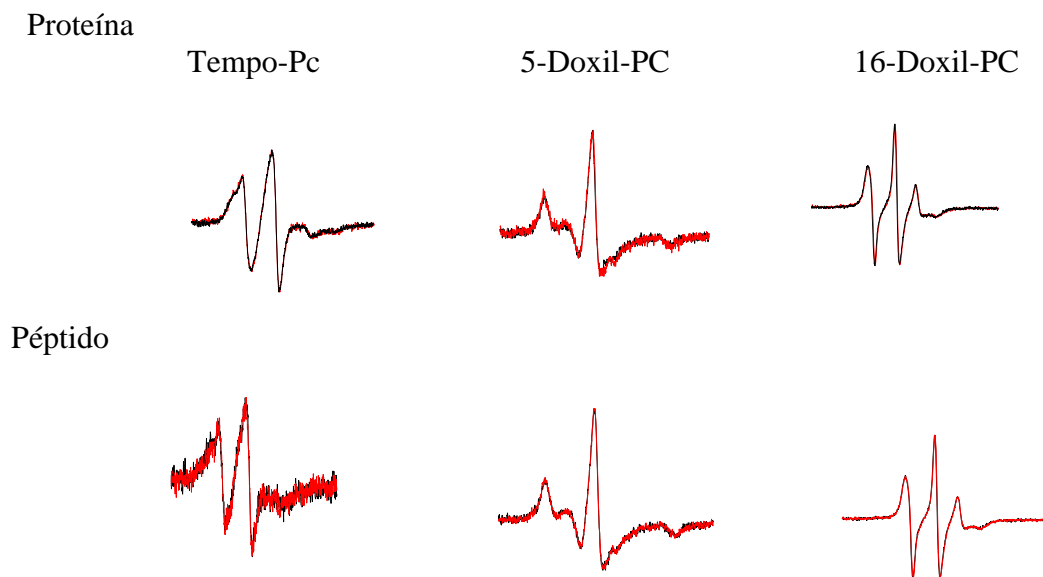


Fig. IV-10(a)
5°C

Fig.IV-10: Espectros de EPR con campo de barrido de 100gaus de vesículas de POPC/Col (4/1 en mol) solas (líneas negras) o con el agregado de apoA-I o AI 77-120 a una relación molar lip/rot. de 15/1. Las temperaturas analizadas fueron 5 (a), 25 (b) y 37 (c) °C

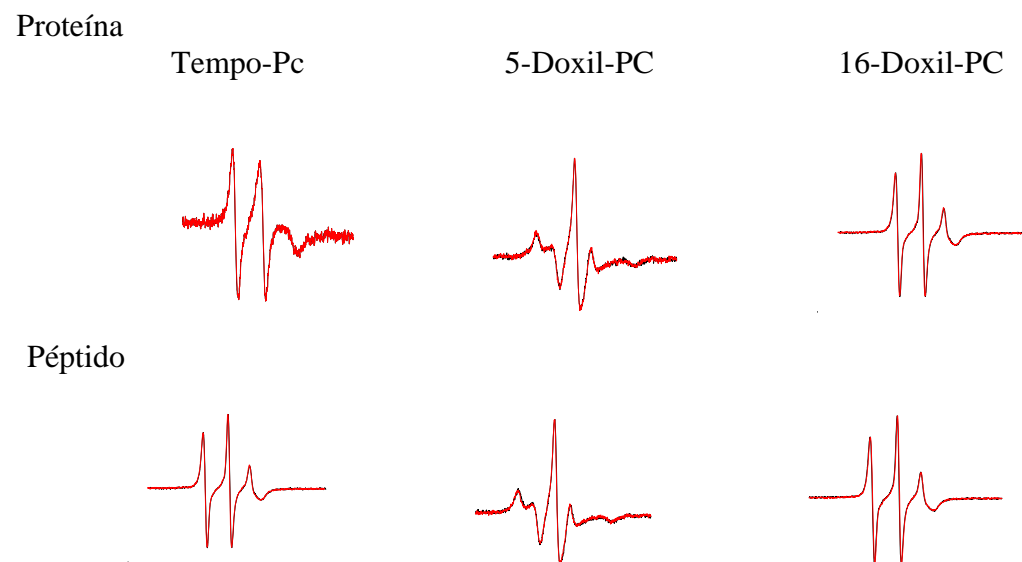


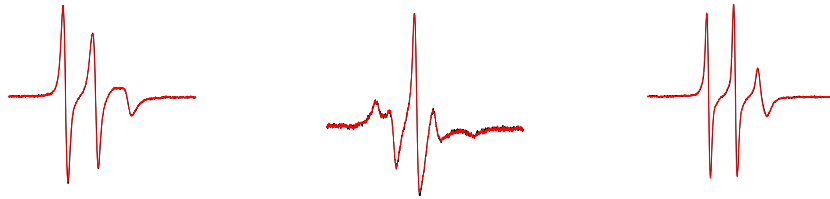
Fig. IV-10(b)
25°C

Proteína:

Tempo-Pc

5-Doxil-PC

16-Doxil-PC



Péptido

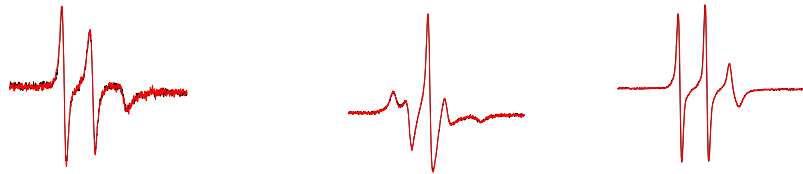


Fig. IV-10(c)
37°C

Como se puede observar en los gráficos, los espectros de Tempo-PC, 5-doxil-PC y 16-doxil-PC en vesículas de POPC/colesterol (4/1 en mol) difieren entre sí y son modificados por la temperatura, pero en ningún caso se observa alguna influencia de apoA-I o AI 77-120. Las mismas mediciones fueron realizadas en vesículas de 100% POPC (datos no mostrados). Si bien los espectros difieren de los obtenidos en presencia de colesterol, en ningún caso se observó algún efecto de apoA-I o AI 77-120.

Dado que tanto apoA-I como AI 77-120 poseen mayor afinidad por vesículas con colesterol, fue de interés determinar si éstos podían tener alguna influencia sobre los espectros de un análogo de colesterol, el 3-β-Doxil- Colestano (CSL, cholesterol spin label). Como ocurrió en las mediciones anteriores, no fue posible detectar cambios en el espectro de CSL mediante este experimento (Figura IV11).

CSL-POPC/COL rela. lip/prot y lip/ peptido 15/1 (5 grados)

CSL-POPC/COL rela. lip/prot y lip/ peptido 15/1 (37 grados)

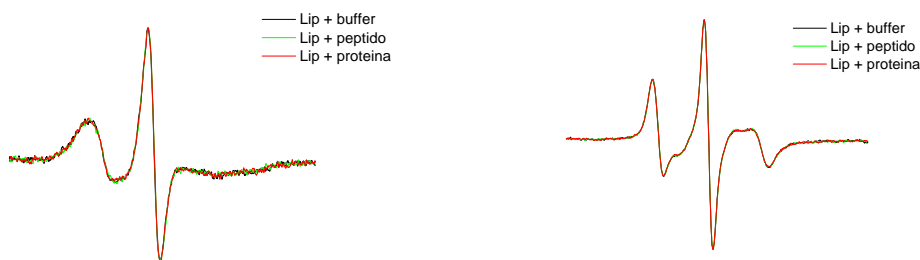


Fig.IV-11: espectros de EPR, (campo barrido de 100 gaus) analizando la interacción de apoA-I y AI 77-120 con vesículas de POPC:col que poseen el 3-β-Doxil- Colestano

La figura IV-11 muestra que tampoco en este caso hubo algún efecto detectable ni a 5°C ni a 37°C.

Las figuras IV-11 y IV-12 indican que la interacción de apoA-I o AI 77-120 con membranas fosfolípídicas no es detectable con las sondas utilizadas. Por lo inesperado de estos resultados, la preparación de apoA-I utilizada en estos experimentos fue ensayada en su actividad para micelizar liposomas multilamelares de DMPC, teniendo una actividad normal en dicho ensayo. Algunas de las mediciones de EPR fueron confirmadas con una segunda preparación de apoA-I proveniente de otro stock de suero.

La posibilidad de que las sondas paramagnéticas en la membrana de las vesículas puedan alterar de alguna manera su estructura y por lo tanto la unión de apoA-I puede ser totalmente descartada, ya que éstas se usan en muy pequeñas proporciones, y como se verá más adelante, las mismas sondas fueron utilizadas en concentraciones muy superiores como extinguidores de la fluorescencia de triptofano de mutantes de apoA-I con resultados positivos. Así, se debe concluir que la interacción de apoA-I y AI 77-120 con vesículas de POPC o POPC/colesterol (4/1 en mol) se produce de tal manera que no afecta a la movilidad promedio de los lípidos del entorno. Esta conclusión también es soportada por mediciones de polarización generalizada de la fluorescencia del Laurdan (una sonda sensible al grado de empaquetamiento de los lípidos en la bicapa lipídica) con la que tampoco se detectó algún efecto de apoA-I (resultados no mostrados).

Mediciones del ordenamiento de los lípidos en complejos lipoproteicos de apoA-I con DMPC generados por la micelización de vesículas en la transición de fase

Mediante el empleo de los marcadores de spin mencionados anteriormente se intentó medir la cinética de formación de discos agregando apoA-I a vesículas de DMPC en la temperatura de transición de fase (24°C); estos espectros no fueron óptimos debido a que la velocidad de barrido del campo es menor a la de la cinética de micelización y por lo tanto la movilidad de los lípidos y los correspondientes marcadores se alteraba a medida que ocurría el proceso. Para evitar este inconveniente, se dejó la mezcla de incubación hasta completar la reacción. Una vez formados los discos, se los dejó a temperatura ambiente (25°C) por 24 horas y se realizaron las medidas a cuatro temperaturas diferentes: dos por debajo de la temperatura de transición de fase (5 y 10 °C), a la temperatura de transición (24°C) y otra por encima de ella,

precisamente a 37°C. Se comparó el valor del parámetro de orden obtenido para cada sonda en los complejos discoidales, SP (parámetro de orden de complejos lipoproteicos) respecto al obtenido en vesículas multilamelares de DMPC SBI (parámetro de orden de marcadores en las vesículas multilamelares utilizadas de blanco). Los resultados se resumen en la siguiente tabla como relación SP/SBI:

Temperatura (°C)	Tempo	5-Pc	16-Pc
	SP/SBI	SP/SBI	SP/SBI
5	1.01	0.99	0.94
10	1.02	0.81	0.95
24	0.96	1.14	1.16
37	0.94	1.11	1.08

Estos resultados indican que el ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos es diferente en los discos con apoA-I que en las vesículas multilamelares. Por debajo de 24 °C, la DMPC se encuentra en fase gel. En estas condiciones, las regiones monitoreadas por los marcadores de spin 5-Doxil- PC y 16-Doxil-PC están menos ordenadas o más fluidas en los discos que en las vesículas multilamelares. Por encima de 24 °C, los marcadores 5-PCSL y 16-PCSL informan que la región de bicapa lipídica monitoreada está más rígida (menor movilidad y/o mayor orden) en los discos que en las vesículas. En cambio, a estas temperaturas, la región fosfolipídica de la cabeza polar, monitoreada por Tempo-PC se muestra algo más fluida (mayor movilidad y/o menor orden) que en las vesículas. En trabajos anteriores, Jonas y colaboradores estudiaron partículas similares (aunque reconstituidas por el método de diálisis con colato), midiendo movilidad de las cadenas acílicas mediante polarización con difenilhexatrieno (DPH), y el grado de hidratación de la superficie mediante el corrimiento de la emisión de fluorescencia de la sonda PRODAN. Ellos definen que, a 37°C, la DMPC se encuentra áltamente empaquetada en estas partículas (Jonas et al., 1987). Asumiendo que la vesícula puede ser tomada como referencia de las bicapa lipídica de los discos en ausencia de proteína, el efecto observado (para la apoA-I) es semejante al encontrado para moléculas que intercalan entre las cadenas hidrocarbonadas, como ser el colesterol. Generalmente, estas por un lado dificultan el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas en el estado gel disminuyendo su ordenamiento, y por otro lado restringen la libre movilidad incrementando el ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas en el estado fluido.

De acuerdo con los modelos de los complejos discoidales, la apoA-I se dispone en el borde del disco con las hélices anfipáticas “protegiendo” a las cadenas hidrocarbonadas de su exposición al medio acuoso, por lo que es razonable asumir una intercalación de la misma entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. Aún con la proteína en el borde del disco, un gran porcentaje de los lípidos sería directamente afectado, por lo que el efecto resultante sería similar al producido por la intercalación. Estos discos contienen alrededor de 120 moléculas de DMPC (60 en cada monocapa) y dos moléculas de apoA-I. Asumiendo un empaquetamiento hexagonal, unas 24 moléculas de DMPC (40%) se localizarán en el borde de cada hemicapa interactuando directamente con las caras hidrofóbicas de las hélices de apoA-I. Los grupos hidrofóbicos de los aminoácidos de la cara no polar de las hélices quedarían intercalados entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos localizados en el borde restringiendo su movilidad en el estado fluido e impidiendo su empaquetamiento ordenado en la fase gel. Si la influencia de la proteína se extendiera al segundo anillo de lípidos más cercanos, el porcentaje de lípidos afectados alcanzaría al 70%.

Esta interacción de las caras hidrofóbicas de las hélices con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos del borde del disco debería ser muy ajustada para evitar la entrada de agua o la exposición al agua de restos hidrofóbicos. El resultado de la misma es que en el estado fluido, el cinturón de hélices de apoA-I “aprieta” a la región de las cadenas hidrocarbonadas restringiendo su movilidad, dejando relativamente “suelta” a la región de los grupos polares. Por debajo de 24 °C, el cinturón de apoA-I actuaría de modo inverso, impidiendo el estrecho empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas pero sin afectar mayormente al ordenamiento en la región de los grupos polares. Esto podría deberse a que la intercalación de los restos de aminoácidos hidrofóbicos entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos del borde dificulta su empaquetamiento. Además, si el cinturón proteico es relativamente rígido también podría dificultar la contracción y compactación de los lípidos en la fase gel. En ausencia de alguna restricción impuesta por la proteína, la superficie del disco lipídico se reduciría de unos 54 a unos 30 nm² al pasar del estado fluido al estado gel (se asume 0,7 y 0,5 nm²/molécula en estado fluido y gel respectivamente). Puede estimarse que el diámetro del disco lipídico se reduciría cerca del 20% en ese proceso. En presencia de un cinturón de hélices rígido, el disco lipídico no podría contraerse libremente ya que su separación del cinturón es energéticamente desfavorable y dejaría un espacio libre para la entrada de agua, por lo que los lípidos no podrían adquirir el estado altamente

compactado y ordenado de la fase gel que presentan en las vesículas de DMPC pura. Así, la influencia de un cinturón proteico rígido sobre las propiedades de los lípidos del disco puede ser muy similar a la producida por compuestos que se intercalan en la bicapa lipídica como el colesterol.

Es de notar que la transición de fase de la DMPC en los discos es menos abrupta que en vesículas multilamelares, pero no desaparece completamente como ocurre en vesículas con muy alto contenido de colesterol. En realidad, los cambios en los parámetros de orden en relación a las vesículas de DMPC pura no son tan grandes como podría esperarse de las consideraciones anteriores ya que no superan el 20% (ver tabla), por lo que aún debería ocurrir un cambio importante en el área ocupada por la DMPC en los discos durante la transición. Por la gran flexibilidad conformacional que presentan las apolipoproteínas intercambiables como apoA-I, es razonable suponer que el "cinturón" de hélices en el borde del disco no sea totalmente rígido y que pueda adaptarse al menos parcialmente al cambio de la superficie de la bicapa lipídica. Aunque no hay datos al respecto, se podría especular sobre dos posibles modos de adaptación: a) La reducción de superficie ocupada por los lípidos podría ocurrir sin cambios en el perímetro si un disco circular se transforma en uno de forma oval, y b) De mantenerse la forma circular, el cinturón proteico podría adaptarse a los cambios de perímetro cambiando el número de hélices en contacto con el borde del disco como ha sido propuesto para HDL discoidales con diferente cantidad de lípidos (ver Introducción).

Estudios con mutantes de apoA-I con un único residuo de triptofano (Trp)

Estudios con mutantes de apoA-I con un único residuo de triptofano (Trp)

El tercer objetivo de este trabajo fue la construcción de una serie de mutantes de apoA-I conteniendo un único residuo Trp en diferentes posiciones de sus hélices Y centrales, para estudiar con ellos la conformación de esta región y su mecanismo de inserción en membranas. Las propiedades de fluorescencia de cada mutante informan sobre el entorno de cada una de las posiciones reportadas por el correspondiente Trp. En principio nos propusimos la obtención de seis mutantes con un único Trp en cada una de las posiciones ocupadas por un residuo hidrofóbico en la región candidata a insertarse en la membrana (posiciones 90, 93, 97, 101, 104 y 108). Estas son denominadas respectivamente W@90, W@93, W@97, W@101, W@104 y W@108. Como control de fluorescencia inespecífica se utilizó la mutante W@0, en la que los cuatro residuos Trp de la proteína madura (en las posiciones 8, 50, 72 y 108) fueron reemplazados por fenilalanina.

Mutagénesis sitio-dirigida para la obtención de las mutantes de apoA-I de Trp único

Como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, la construcción de los cDNA mutantes se realizó por mutagénesis sitio dirigida usando el kit “Quick-Change” de Stratagen a partir del mutante W@0. El plásmido más el inserto de pre proapoA-I tiene una extensión de 6500 pares de bases.

Las secuencias diseñadas de oligonucleótidos iniciadores fueron las siguientes:

Leu 90 a Trp

Primer 1: 5'-G GAG ATG AGC AAG GAT **TGG** GAG GAG GTC AAG GCC-3'
Primer 1': 3'-C CTC TAC TCG TTC CTA ACC CTC CTC CAG TTC CGG-5'

Val 93 a Trp

Primer 2: 5'-GCC AAG GAT CTG GAG GAG **TGG** AAG GCC AAG GTG C-3'
Primer 2': 3'-CGG TTC CTA GAC CTC CTC ACC TTC CGG TTC CAC G-5'

Val 97 a Trp

Primer 3: 5'- G GAG GTG AAG GCC AAG **TGG** CAGCCC TAC CTG GAC G-3'
Primer 3': 3'- C CTC CAC TTC CGG TTC ACC GTC GGG ATG GAC CTG C-5'

Leu 101 a Trp

Primer 4: 5'- GCC AAG GTG CAG CCC TAC **TGG** GAC GAC TTC CAG-3'
Primer 4': 3'- CGG TTC CAC GTC GGG ATG ACC CTG CTG AAG GTC-5'

Phe104 a Trp

Primer 5: 5'- CC TAC CTG GAC GAC **TGG** CAG AAG AAG TTC CAG G-3'
Primer 5': 3'- GG ATG GAC CTG CTG ACC GTC TTC TTC AAG GTC C-5'

Phe108 a Trp

Primer 6: 5'- C TTC CAG AAA AAG **TGG** CAG GAG GAG ATG G-3'
Primer 6': 3'- G AAG GTC TTT TTC ACC GTC CTC CTC TAC C-5'

Estos Primer fueron sintetizados en el Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA

En primera instancia, se logró obtener con éxito la mutación en la posición 108 (W@108). La obtención de las restantes mutaciones se vio demorada por desperfectos en el equipamiento del instituto, pero luego se adquirió un equipo nuevo de ciclación y se volvió a poner a punto las reacciones de PCR. Esta etapa no fue sencilla, debido a que por diferentes causas las reacciones no poseían la misma eficiencia para todas las mutaciones deseadas, por lo que se buscaron las condiciones de amplificación para cada una de ellas.

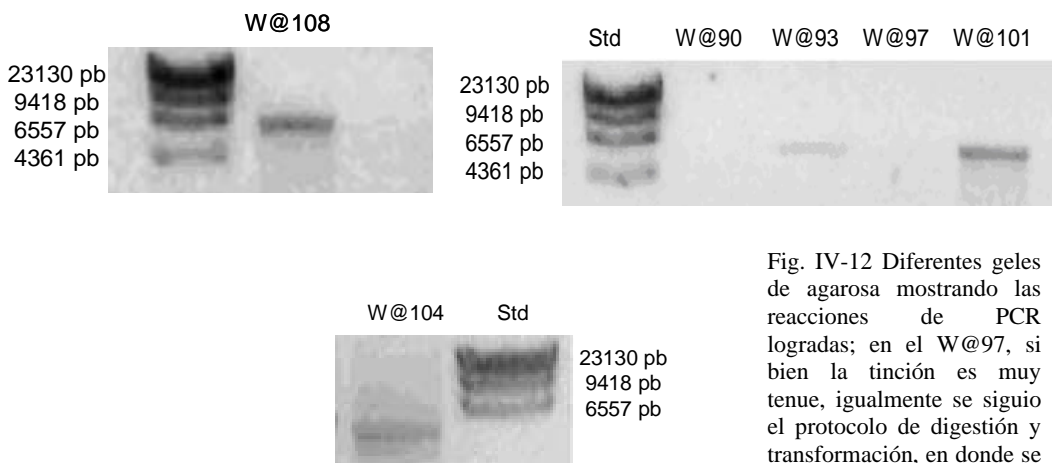


Fig. IV-12 Diferentes geles de agarosa mostrando las reacciones de PCR logradas; en el W@97, si bien la tinción es muy tenue, igualmente se siguió el protocolo de digestión y transformación, en donde se logro el mutante.

Expresión, purificación y clivaje de las proteínas de fusión de los mutantes anteriores

Se utilizaron en una primera instancia, los plásmidos conteniendo los insertos de cDNA de las formas pro-apoA-I, W@0 y W@108 para transformar mediante shock térmico bacterias de expresión (BL21). Se verificó con cultivos en pequeña escala (4 ml de medio de cultivo) que las bacterias BL21 transformadas expresaran las respectivas proteínas al ser inducidas con IPTG, para luego pasar a expresar en mayor cantidad (1 litro de medio de cultivo); así se logró, de estas proteínas recombinantes un rendimiento aproximado de 15 mg de proteína purificada/l.

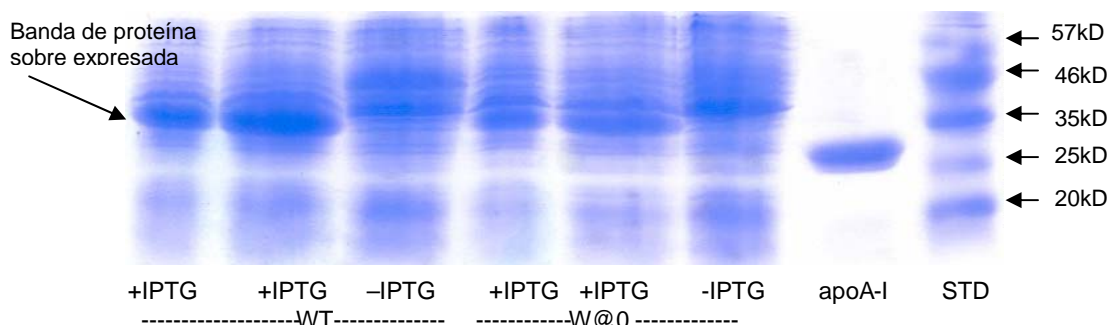


Fig.IV-13: En las figuras se muestran dos geles de SDS PAGE de proteínas totales de bacterias inducidas y no inducidas con IPTG

Estos pasos se repitieron con los mutantes W@93, W@101, W@104, y W@108 cuyas secuencias fueron confirmadas. En el caso de W@101, no se observó expresión a pequeña escala, esto puede ser debido a la toxicidad del mutante en cuestión, aunque no puede descartarse una mutación en el promotor u otro sitio del plásmidos que no afecte a la secuencia de la proteína, pero que disminuya la expresión. Por ello, se intentó igualmente en numerosas ocasiones y con distintas condiciones pasar a la expresión a gran escala. Se optó como protocolo la obtención de biomasa, (crecimiento hasta una DO_{650} cercano a uno), e inducción con IPTG. En este punto el crecimiento bacteriano se detiene, y los recursos del medio de cultivo son derivados a la obtención de proteínas. Este cambio de estrategia se usó para las mutantes W@97 y W@104, obteniéndose un rendimiento de 2-5 mg por litro de medio, pero siguió siendo negativo para el 101.

Las proteínas expresadas fueron purificadas por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) como se menciona en materiales y métodos. Para esto se usaron columnas con una matriz conteniendo $ZnCl_2$ (Boehringer) ó $NiSO_4$, a las que las proteínas con cola de histidina se adsorben por afinidad. Las proteínas contaminantes se lavan, primero con buffer fosfato, luego con el mismo buffer con baja concentración de imidazol y finalmente se eluyen las proteínas de interés mediante competencia con buffer conteniendo 0,5 M de imidazol. Se siguió la elución por Absorbancia 280nm cada 2 ml de eluido y la pureza de éstos se controló por SDS-PAGE. El rendimiento promedio obtenido fue apropiado, y dependiendo de la mutante en cuestión, del orden de 10-15 mg por litro de medio. La figura IV-14 muestra un perfil de elución típico durante los pasos de purificación, y la figura IV-15 la pureza de la preparación final.

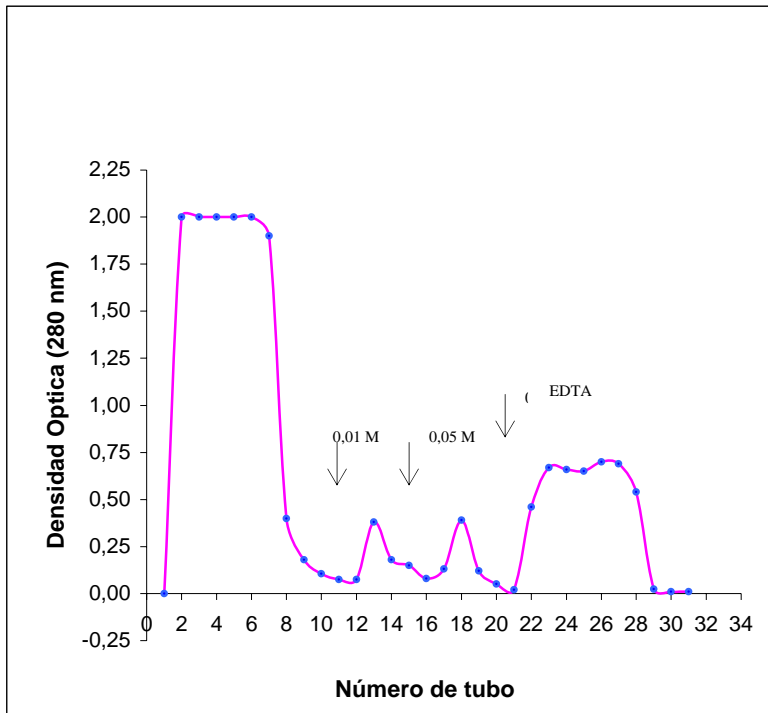


Fig.IV-14: Purificación de apoA-I WT por IMAC. Las proteínas se eluyeron con concentraciones crecientes de imidazol, a fin de eliminar contaminantes de baja afinidad. Se colectaron fracciones cada 2 ml, registrando DO a 280 nm.

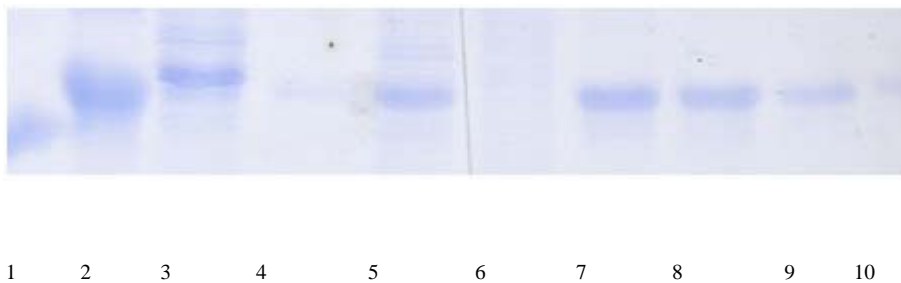


Fig. IV-15: Seguimiento de la purificación de pro-apoA-I WT por SDS-PAGE: 1) ApoA-I de suero; 2) Proteína de fusión de una mutante de apoA-I con cola de polihistidina usada como estándar; 3) Precipitado (solubilizado en el buffer con SDS) luego de la centrifugación al tratar con guanidina 3M; 4) Precipitado (solubilizado en el buffer con SDS) luego de la diálisis; 5) sobrenadante de la centrifugación, luego de la diálisis; 6-9) Fracciones 4, 18, 22, 23 y 27 respectivamente, eluidas de la columna de $ZnCl_2$

Se reunieron las fracciones eluidas con 0,5 M imidazol (fracciones 22 y 23, calles 8 y 9) para la preparación final considerada pura.

Lamentablemente, por razones desconocidas al momento, todos los clones de la proteína mutante W@97 perdieron la capacidad de expresión, por lo que se decidió

continuar trabajando con los mutantes W@0, W@93, W@104 y W@108, que siempre dieron una expresión adecuada de proteína.

Corte con enzima proteolítica

La reacción de clivaje con Igasa es muy específica, pero como se mencionó, muy dependiente de las condiciones usadas, siendo las de mejor resultado la incubación durante 24 horas a 32 °C en buffer tris 20mM, EDTA 5 mM, pH 7,8 usando en todas las muestras la misma cantidad de proteína (en relación 0.525 µg de igasa/mg de proteína a digerir); y terminando la reacción con PMSF. De esta manera se logró obtener las proteínas mutantes de alto grado de pureza (figura IV-16) para ser usadas en cantidades suficientes para los distintos ensayos de caracterización y demás mediciones.

La mayor dificultad con la Igasa (al menos en nuestro país) es que además de áltamente costosa es muy inestable durante el transporte desde su lugar de origen y durante su almacenamiento. Por esta razón, paralelamente a la obtención de los mutantes de Trp único clivables por Igasa, se trabajó en la introducción en el cDNA de pro-apoA-I salvaje de una región codificante para un sitio de clivaje no enzimático (sensible al medio ácido) en la región donde finaliza el pro-segmento. Aunque esta modificación no fué utilizada para la obtención de las mutantes que se utilizaron en este trabajo, demostró ser muy efectiva y permitirá en el futuro el independizarnos de la Igasa.

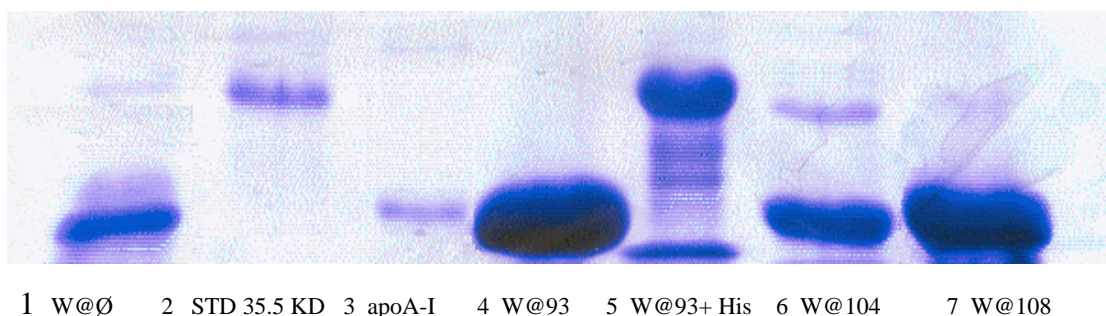


Fig. IV-16: SDS-PAGE 12 % en donde se muestran el resultado de la proteólisis con Igasa de los mutantes W@Ø, W@93, W@104, W@108

Luego de la proteólisis con Igasa, las muestras son nuevamente pasadas a través de las columnas de IMAC. Esta retiene al péptido con el segmento poli-His liberado así como a la proteína de fusión que no haya sido clivada, (como se observa en la calle 1, 6 y 7). En el no retenido, se recupera a la proteína libre del segmento poli-His.

Como conclusión de esta etapa del trabajo, de las mutantes que se plantearon originalmente se lograron obtener en cantidades adecuadas para los estudios subsiguientes a W@93, W@104 y W@108, además de W@0 que se usó como blanco de fluorescencia inespecífica.

En una primera etapa, estas mutantes fueron caracterizadas, a fin de comprobar la ausencia de alteraciones estructurales y/o funcionales significativas por la sustitución aminoacídica. Así se estudió su estructura secundaria y funcionalmente determinando su capacidad para reaccionar espontáneamente con vesículas de DMPC a la temperatura de transición y formar HDL discoidales.

1. Caracterización de las mutantes obtenidas

1.a) Dicroísmo circular

La estructura secundaria de los mutantes W@93, W@104 y W@108 fue analizada mediante DC en el UV lejano, en comparación con el W@Ø (Fig IV-17).

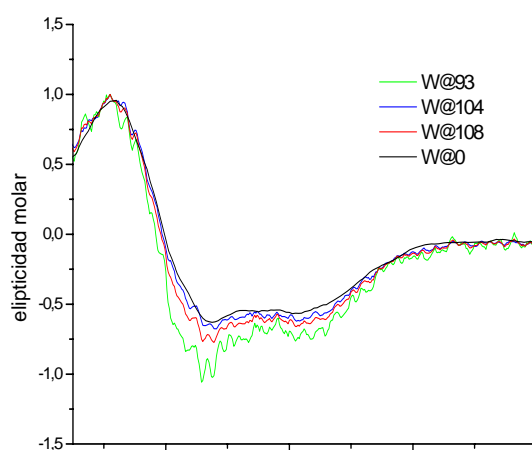


Fig. IV-17: Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano medidos a 28 °C, a una concentración de 0.1 mg/ml

Se puede observar que las mutaciones introducidas a W@Ø no afectan significativamente la estructura secundaria de la proteína, y representan además el espectro típico obtenido para la apoA-I de suero (Leroy et al., 1993) (Li et al., 2004)

1.b) Capacidad de las proteínas mutantes con único Trp para microsolubilizar vesículas de DMPC y generar complejos lipoproteicos

La capacidad de las proteínas mutantes para microsolubilizar vesículas de DMPC a 24 °C se comparó con la de la proteína salvaje siguiendo la cinética de reacción por la disminución de la DO a 350nm (dado que la formación de partículas más pequeñas a expensas de la DMPC solubilizada desde los liposomas multilamelares, redundan en una disminución de la turbidez total de la muestra). El ensayo se realizó con una relación molar fosfolípido/proteína de 40:1 (con una concentración de proteína de 0.2 mg/ml), normalizando los ensayos a una misma DO inicial.

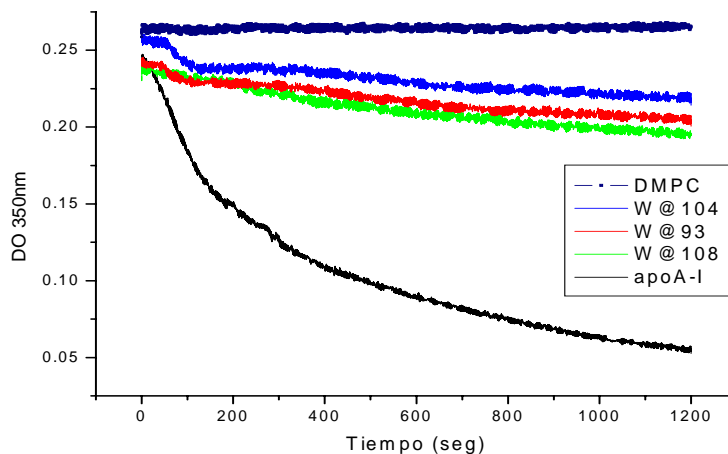


Fig. IV-18: Micelización de vesículas multilamelares de DMPC a 24°C inducida por los mutantes de apoA-I utilizados.

En la figura IV-18 se puede observar que las tres mutantes de Trp único micelizan a las vesículas de DMPC más lentamente que la apoA-I salvaje. Ya que W@108 tiene la misma secuencia de apoA-I salvaje en la región central, la menor velocidad de micelización observada para las mutantes no puede ser atribuida a los cambios en esta región, sino a alguno de los que son comunes en todas las mutantes (Trp8 → Phe, Trp50 → Phe o Trp72 → Phe).

Aunque la velocidad de micelización es menor para las mutantes que para apoA-I salvaje, la extensión de la reacción es similar en todos los casos, ya que, al cabo de 8 hs todas las proteínas alcanzan una DO de 0.1 (no mostrado). Este producto final fue analizado mediante PAGE en condiciones nativas, observándose la formación de productos lipoproteicos. Como fue descrito en la literatura (Li et al., 2004), estos complejos corresponden a estructuras discoidales cuyo tamaño es dependiente de la relación fosfolípido/apoA-I inicial. Con la relación utilizada en este caso se obtuvieron discos de 240 kD (aproximadamente 98 Å de diámetro) (ver figura IV-19)



Fig. IV-19: PAGE nativo en gradiente 4-20% en donde se muestra el resultado de la micelización al cabo de 8 horas.

2. Estudios por espectroscopía de fluorescencia

Las propiedades de la fluorescencia del Trp en estas mutantes son a continuación utilizadas para obtener información sobre la conformación de las repeticiones tipo Y del centro de la molécula de apoA-I en los estados libre, unido a la membrana de vesículas fosfolipídicas o en complejos HDL discoidales. Se analiza: a) el grado de exposición al medio acuoso de los Trp, b) distancias intermoleculares entre los Trp por homotransferencia de energía y c) la extinción o apagado (quenching) de su fluorescencia por grupos paramagnéticos de diferente localización en la bicapa lipídica.

2.a) Estudios de fluorescencia en el estado libre de lípidos. Evidencias de que las hélices Y centrales participan en la oligomerización de apoA-I

En el estado libre de lípidos, se realizaron las medidas de fluorescencia en condiciones nativas y desnaturizantes con Guanidina-HCl 3M, condición en la que se sabe que la proteína se encuentra completamente desplegada (Leroy et al., 1993)

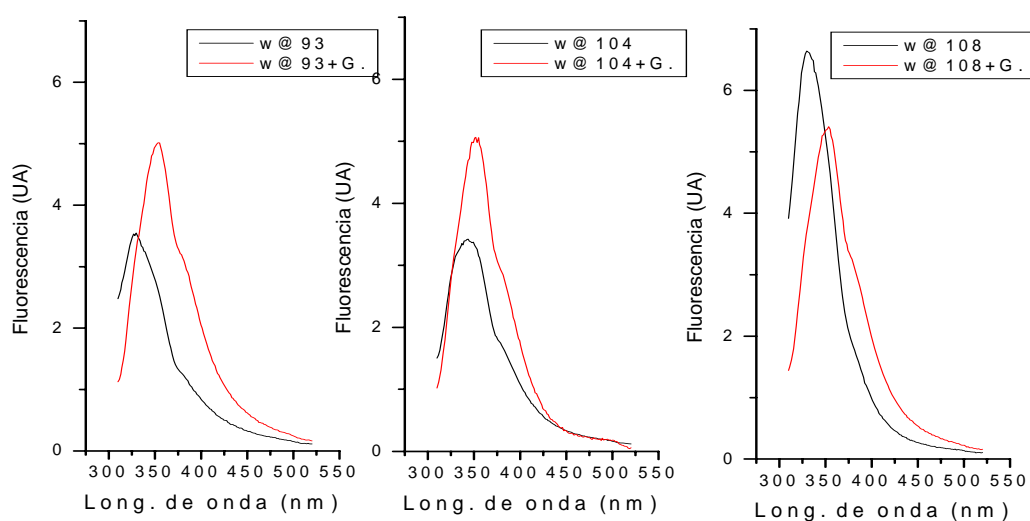


Fig.IV-20: Espectros de fluorescencia en condiciones nativas y desnaturizantes

Para ello se obtuvo el espectro de los distintos mutantes en un espectrofluorómetro SLM4800 con cubetas de paso óptico de 0.2 cm para excitación, y 1 cm para la emisión. Se usó una concentración de proteína de 0.1 mg/ml en buffer fosfato 25 mM, pH=7.4, excitando a 295 nm y registrando el espectro de emisión entre 300 y 550 nm con slits de emisión y excitación de 8. Temperatura de 25 °C.

	Intensidad UA (Unidades Arbitrarias)		λ_{max} . (nm)	
	Sin guanidina	Con guanidina	Sin guanidina	Con guanidina
W@93	3.53	5.00	330	350
W@104	3.40	5.02	342	351
W@108	6.61	5.05	331	351

Tabla IV-1: se muestran en la tabla las intensidades de fluorescencia en unidades arbitrarias y los max. de emisión de las mutantes de W@93, W@104 y W@108.

En la tabla IV-1 se resumen los datos espectrales mostrados en la figura IV-20: Se puede observar que, en los mutantes W@93 y W@108, el Trp se encuentra en un ambiente ó entorno relativamente no polar, como lo indica la longitud de onda del máximo de emisión; mientras que el Trp de W@104 estaría en un entorno relativamente más polar. Como es de esperar, todos los mutantes sufren un corrimiento de la fluorescencia del Trp hacia mayores longitudes de onda (corrimiento al rojo) cuando se desnaturalizan con guanidina-HCl 3M. Esto indica que cierto grado de “protección” de la exposición de los Trp al medio acuoso que existe en la proteína nativa, desaparece en la proteína completamente desnaturalizada.

Generalmente, la exposición al entorno acuoso de Trp produce una apreciable disminución en su rendimiento cuántico además del mencionado corrimiento al rojo de la fluorescencia. Se puede observar que si bien esto ocurre en alguna medida para el caso del mutante W@108 cuando se desnaturaliza con guanidina-HCl (se observa una disminución en la intensidad de emisión acompañando al corrimiento al rojo), lo contrario ocurre para W@93 y W@104 (el corrimiento de la emisión al rojo va acompañado de un aumento en intensidad)

Este fenómeno se podría explicar por el hecho de que en condiciones nativas la apoA-I se encuentra en equilibrio entre monómero, dímero, y mayores oligómeros (McGuire et al., 1996). Si los residuos de Triptofano se encuentran muy próximos entre sí en los oligómeros, podría ocurrir en ellos el fenómeno de homotransferencia de energía, que resultaría en una disminución del rendimiento cuántico en el estado nativo. Como la desnaturalización con guanidina-HCl resulta en la disrupción de la estructura oligomérica y la completa monomerización de la proteína, la homotransferencia de energía dejaría de ocurrir y se produciría un aumento en la intensidad de fluorescencia.

Además de disminuir el rendimiento cuántico, la homotransferencia de energía resulta en una disminución de la anisotropía de la emisión, y esto puede ser utilizado para su reconocimiento. Para constatar si ocurre este fenómeno debido a la oligomerización en las mutantes no desnaturalizadas, se realizaron mediciones de intensidad y anisotropía en función de la concentración de las proteínas. Ya que el aumento de concentración proteica desplaza el equilibrio hacia la formación de oligómeros, de existir homotransferencia de energía en éstos, la misma debería aumentar con la concentración, lo que debería observarse como un decrecimiento en el rendimiento cuántico y la anisotropía.

Los espectros de emisión (normalizados por la concentración proteica) para diferentes concentraciones de proteína entre 0.0125 y 0.1 mg/ml se muestran en la figura IV-21 y los datos de intensidad normalizados por la concentración (proporcionales al rendimiento cuántico) y la longitud de onda del máximo de la emisión son indicados en la tabla IV-2.

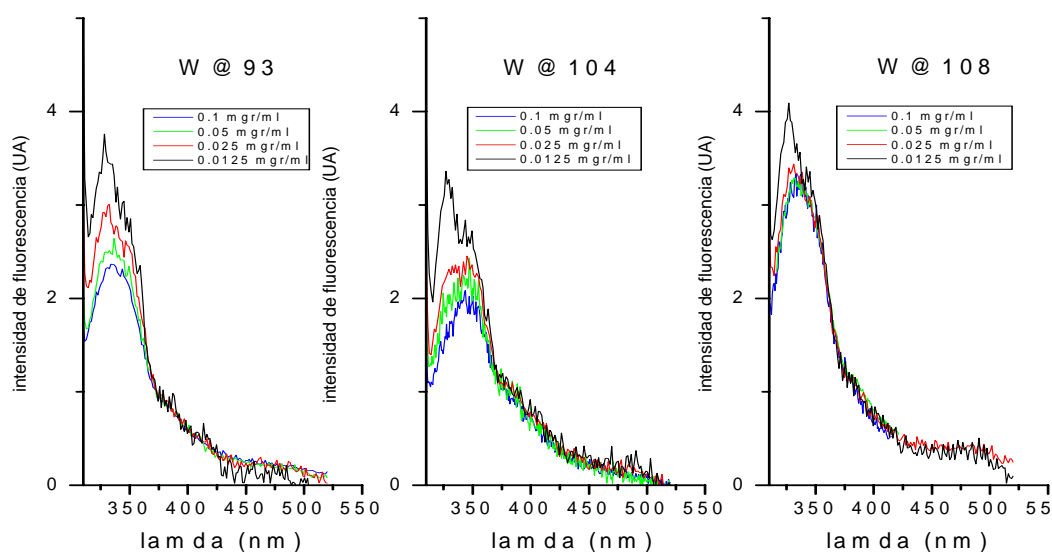


Fig. IV-21: Espectros de fluorescencia a diferentes concentraciones de proteínas corregidos por la concentración

	Conc. de prot. 0.1 mg/ml		Conc. de prot. 0.05 mg/ml		Conc. de prot. 0.025 mg/ml		Conc. de prot. 0.0125mg/ml	
	Intensidad (UA)	λ max (nm).	Intensidad (UA)	λ max. (nm)	Intensidad (UA)	λ max (nm).	Intensidad (UA)	λ max (nm).
W@93	2.35	334	2.49	335	3.11	334	3.44	333
W@104	1.99	345	2.23	344	2.40	343	2.70	343
W@108	3.20	333	3.27	334	3.33	333	3.50	334

Tabla IV-2: Datos de intensidad de fluorescencia (Unidades Arbitrarias) normalizados y máximos de emisión en función de la concentración de proteína

No se observan corrimientos en las longitudes de onda de emisión en función de la concentración de proteína para ninguna de las mutantes, indicando que la oligomerización no produce cambios en la polaridad del entorno de los Trp. Tanto en monómeros como en oligómeros, la posición reportada por W@104 se encuentra en un entorno relativamente más polar que las reportadas por W@93 y W@108

La dependencia de la intensidad normalizada y de la anisotropía con la concentración de proteína se muestra en la figura IV-22. Se observa que en las tres mutantes (pero especialmente en W@93 y W@104) ocurre una disminución en el rendimiento cuántico y la anisotropía de emisión de Trp al incrementarse la concentración proteica, indicando la existencia de homotransferencia de energía en los oligómeros. Es de notar que los R_0 para la homotransferencia Trp-Trp son del orden de 4-15 Å dependiendo del entorno (Lakowicz, 1999) por lo que la homotransferencia no sería detectable a distancias mayores de 20-25 Å como máximo. Así, estos resultados indican que las hélices Y centrales de apoA-I (donde se encuentran los Trp de estas mutantes) participan en la dimerización (y oligomerización) de esta proteína quedando en estrecho contacto entre sí en los oligómeros.

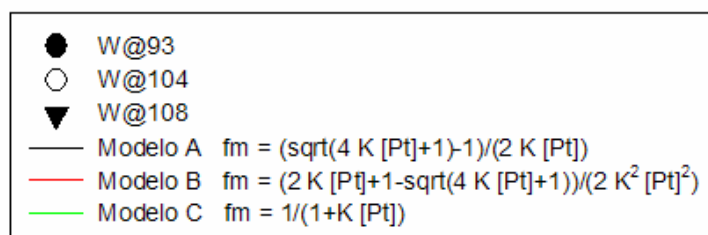
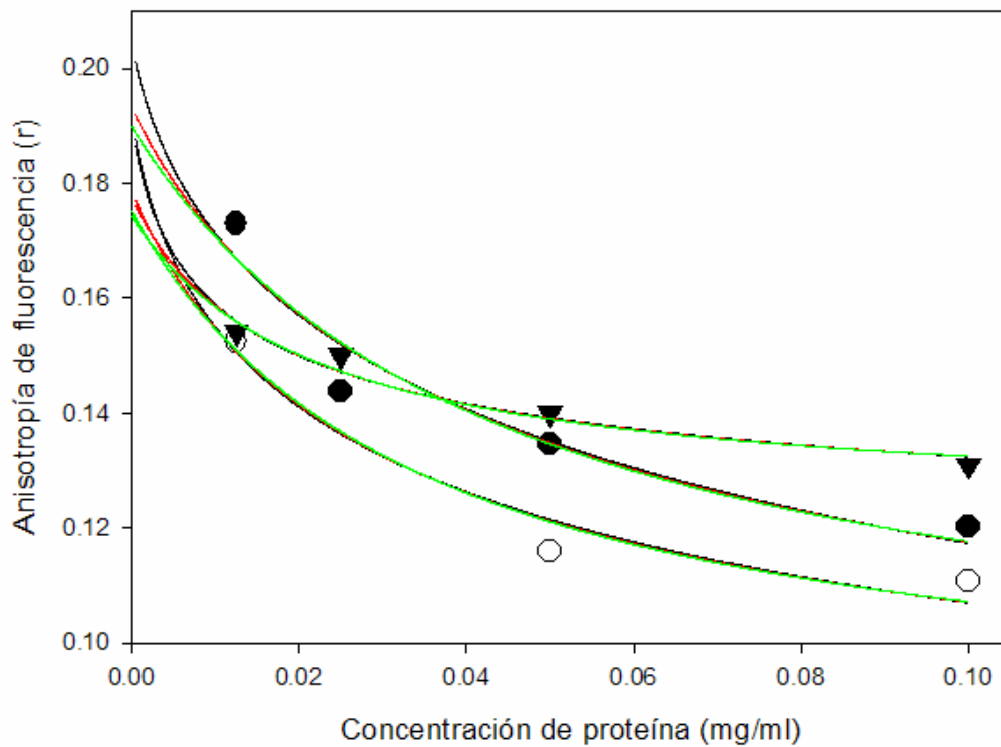
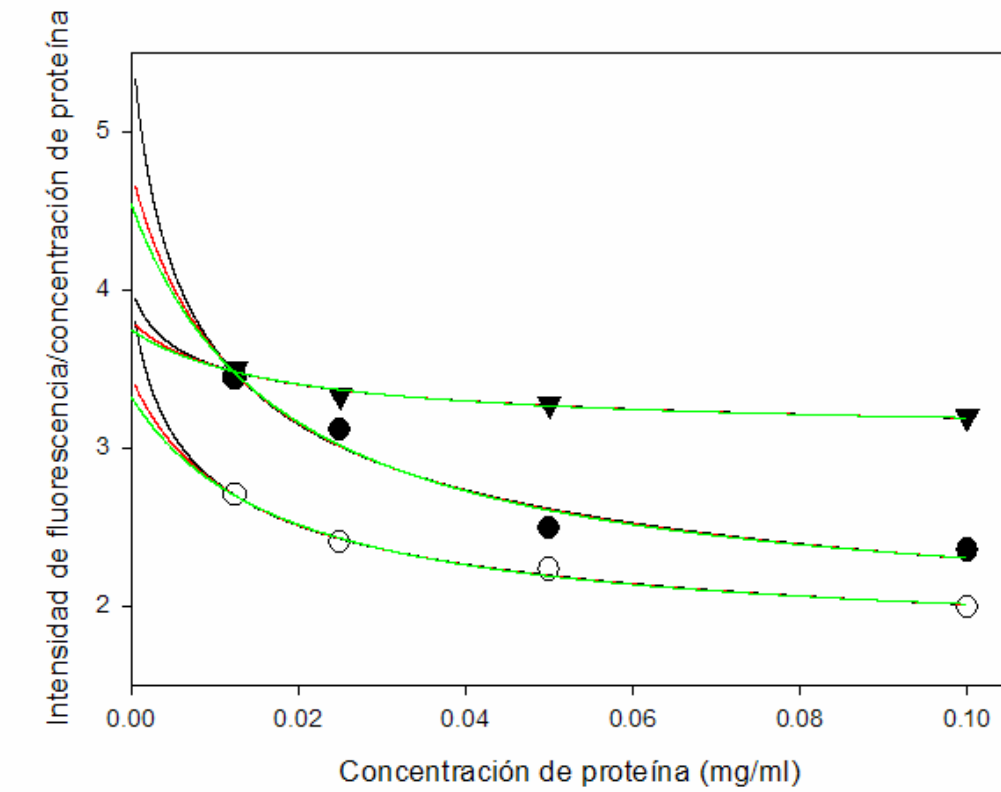


Figura IV-22. Influencia de la concentración de proteína sobre la intensidad (arriba) y anisotropía (debajo) de la fluorescencia de W@93, W@104 y W@108.

A continuación se trató de calcular la eficiencia de homotransferencia de energía en los oligómeros ya que de ella sería posible estimar las distancias intermoleculares entre las posiciones ocupadas por los Trp en estas mutantes. Para estimar la eficiencia de homotransferencia es necesario conocer la intensidad (y/o anisotropía) de la emisión de la proteína monomérica y de la proteína oligomérica por separado. Ya que en el rango de concentración medible es imposible tener 100% de monómeros o 100% de oligómeros, la intensidad y anisotropía de los mismos se obtuvo por extrapolación a dilución infinita (para el monómero) o concentración infinita (para el oligómero). Se asumió que la intensidad de fluorescencia normalizada por la concentración (F_n) sigue la relación:

$$F_n = F/[Pt] = (F_{em} [Pm] + F_{eo} [Po])/[Pt] = F_{em} f_m + F_{eo} f_o = F_{em} f_m + F_{eo} (1-f_m)$$

donde $[Pt]$, $[Pm]$ y $[Po]$ son respectivamente las concentraciones (en mg/ml) de proteína total, monomérica y oligomérica. F_{em} y F_{eo} son respectivamente la fluorescencia específica (por unidad de concentración) de monómeros y oligómeros; siendo f_m y f_o las fracciones de proteína monomérica y oligomérica respectivamente ($f_m=[Pm]/[Pt]$ y $f_o=[Po]/[Pt]$), que cumplirán la relación: $f_m + f_o = 1$

Por otro lado, la anisotropía de fluorescencia (r) estará dada por:

$$r = (r_m F_{em} [Pm] + r_o F_{eo} [Po]) / (F_{em} [Pm] + F_{eo} [Po])$$

donde r_m y r_o son las anisotropía de la emisión del monómero y de oligómeros, respectivamente. Expresando r en función de las fracciones f_m y f_o :

$$r = (r_m F_{em} f_m + r_o F_{eo} f_o) / (F_{em} f_m + F_{eo} f_o)$$

$$\text{ó } r = (r_m F_{em} f_m + r_o F_{eo} (1-f_m)) / (F_{em} f_m + F_{eo} (1-f_m))$$

Se asume así que tanto el rendimiento cuántico como la anisotropía son independientes del número de agregación. Esto es, ellas serán iguales en dímeros, trímeros u oligómeros de mayor tamaño.

Se asumieron tres modelos diferentes para la dependencia de la fracción de proteína monomérica (f_m) con la concentración de proteína total $[Pt]$:

A) El primero fue considerar un equilibrio simple entre monómeros y dímeros. Si bien es sabido que apoA-I puede formar agregados mayores, sólo se detectan dímeros a una concentración de 0,1 mg/ml (McGuire et al., 1996). En este caso, la relación entre f_m y $[Pt]$ será:

$$f_m = (\sqrt{4 K [Pt]+1}-1)/(2 K [Pt])$$

B) El segundo modelo desarrollado fue

$$f_m = (2 K [Pt]+1-\sqrt{4 K [Pt]+1})/(2 K^2 [Pt]^2)$$

C) En el tercer modelo se asumió un número de agregación infinito y que la constante de asociación de un monómero a un oligómero no cambia con el número de agregación previo. Esto resulta en la siguiente relación relativamente sencilla cuya derivación se explica en el Apéndice I

$$f_m = 1/(1+K [Pt])$$

Las tres ecuaciones indicadas fueron ajustadas por medio de regresión no lineal a los datos experimentales (curvas de intensidad normalizada y de anisotropía vs. concentración de proteína) de manera de estimar los parámetros F_m , F_o , r_m y r_o para cada uno de los mutantes. Las constantes de equilibrio (K) no variaron mayormente entre las diferentes mutantes, indicando que las mutaciones no modifican la tendencia de la proteína a oligomerizar. Por tanto, se realizó un ajuste conjunto a los datos de las tres mutantes asumiendo la misma constante de equilibrio para todas. Los parámetros obtenidos son indicados en la tabla 3 y las curvas de regresión para los tres modelos asumidos se muestran en la figura IV-22. Los tres modelos sólo difieren apreciablemente entre sí a muy bajas concentraciones de proteína, por lo que no es posible distinguir cuál se ajusta mejor a los datos experimentales. El tercer modelo, sin embargo, resultó en un menor error para los parámetros calculados.

Se hicieron dos estimaciones de la eficiencia de homotransferencia de energía Trp-Trp en los oligómeros. La primera (E_f) a partir de los valores de fluorescencia específica de monómeros y oligómeros (F_m y F_o), y la segunda (E_r) usando los correspondientes valores de anisotropía (r_m y r_o). Con estos valores de eficiencia se realizaron dos estimaciones de las distancias Trp-Trp en los oligómeros (d_f y d_r). Como puede observarse en la tabla 3, las distancias así estimadas son relativamente independientes dentro del margen de error tanto del modelo de oligomerización asumido, como de si estas distancias son estimadas a partir de los datos de intensidad o de anisotropía de fluorescencia. Para W@93 y W@104 y, los correspondientes Trp se

encuentran a una distancia estimada entre los 3,5 y 5 Å en los oligómeros, mientras que esta distancia es un poco mayor para el caso de W@108.

Estos resultados indican que el par de hélices Y centrales de apoA-I participa interactuando entre sí en el proceso de oligomerización, quedando en estrecho contacto en los oligómeros

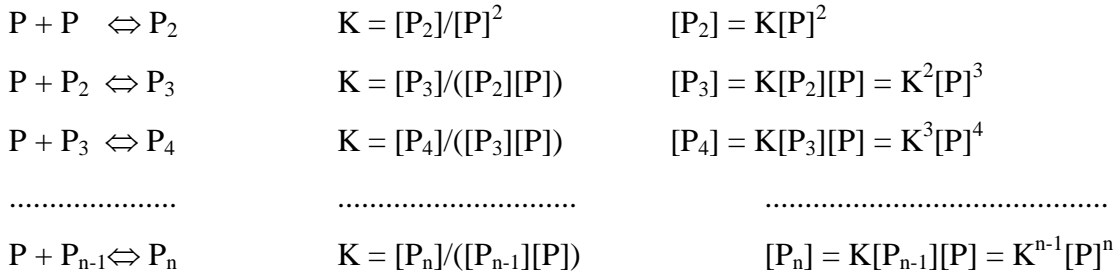
Tabla IV-3 Intensidad y anisotropía de fluorescencia de las mutantes W@93, W@104 y W@108 en los estados monomérico y oligomérico. Eficiencia de homotransferencia de energía y distancias estimadas entre los Trp en los oligómeros.

Mut.	Modelo	Fem	Feo	rm	ro	Ef	Er	df (Å)	dr (Å)
W@93	A	5,65 ± 2,79	1,39 ± 0,42	0,204 ± 0,013	0,021 ± 0,025	0,75 ± 0,20	0,90 ± 0,13	4,1 ± 0,7	3,5 ± 0,8
	B	4,76 ± 0,85	1,81 ± 0,25	0,193 ± 0,011	0,078 ± 0,014	0,62 ± 0,12	0,60 ± 0,09	4,6 ± 0,4	4,7 ± 0,3
	C	4,54 ± 0,58	1,89 ± 0,20	0,190 ± 0,010	0,086 ± 0,012	0,58 ± 0,10	0,55 ± 0,09	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,3
W@104	A	3,98 ± 1,66	1,47 ± 0,27	0,192 ± 0,015	0,045 ± 0,018	0,63 ± 0,22	0,77 ± 0,11	4,6 ± 0,7	4,1 ± 0,4
	B	3,45 ± 0,52	1,72 ± 0,17	0,179 ± 0,012	0,078 ± 0,011	0,50 ± 0,12	0,56 ± 0,09	5,0 ± 0,4	4,8 ± 0,3
	C	3,32 ± 0,36	1,77 ± 0,14	0,175 ± 0,011	0,084 ± 0,009	0,47 ± 0,10	0,52 ± 0,08	5,1 ± 0,3	4,9 ± 0,3
W@108	A	4,02 ± 0,74	2,96 ± 0,17	0,191 ± 0,007	0,111 ± 0,005	0,26 ± 0,18	0,42 ± 0,05	5,9 ± 0,9	5,3 ± 0,2
	B	3,80 ± 0,27	3,07 ± 0,12	0,178 ± 0,005	0,121 ± 0,004	0,19 ± 0,09	0,32 ± 0,04	6,3 ± 0,6	5,7 ± 0,2
	C	3,75 ± 0,21	3,09 ± 0,10	0,174 ± 0,005	0,123 ± 0,003	0,18 ± 0,07	0,29 ± 0,04	6,5 ± 0,5	5,8 ± 0,2

Los valores de intensidad de fluorescencia específica y anisotropía de monómeros (Fem y rm) y oligómeros (Feo y ro), así como los correspondientes errores estándares indicados fueron obtenidos por regresión no lineal ajustando las ecuaciones correspondientes a los modelos A, B y C a los datos experimentales de la figura IV-22. La eficiencia para la homotransferencia de energía y la distancia entre los Trp en los oligómeros fueron calculadas a partir de los valores de intensidad (Ef y df, respectivamente) o a partir de los valores de anisotropía (Er y dr respectivamente). Los errores indicados para las estimaciones de eficiencia y distancias se obtuvieron por progresión de los errores de intensidad y anisotropía. Para la estimación de las distancias se usó un valor de R0 de 5 Å

Apéndice I: Derivación de la dependencia de la concentración de proteína monomérica en función de la concentración de proteína total

Si la oligomerización de una proteína ocurre por la adición de un monómero a un oligómero preformado, se pueden plantear los siguientes equilibrios. Si la constante de equilibrio (K) es la misma independientemente del número de agregación, tendremos además las siguientes relaciones:



Además, la concentración total de proteína en mg/ml ([Pt]) será la suma de concentraciones de las diferentes especies de oligómeros:

$$[Pt] = [P] + [P_2] + [P_3] + [P_4] + \dots + [P_{n-1}] + [P_n] \tag{a}$$

$$[Pt] = [P] + K[P]^2 + K^2[P]^3 + K^3[P]^4 + \dots + K^{n-2}[P]^{n-1} + K^{n-1}[P]^n \tag{b}$$

Si multiplicamos ambos miembros de la ecuación (b) por K:

$$K[Pt] = K[P] + K^2[P]^2 + K^3[P]^3 + K^4[P]^4 + \dots + K^{n-1}[P]^{n-1} + K^n[P]^n \tag{c}$$

Y dividiendo ambos miembros de la ecuación (b) por [P]:

$$[Pt]/[P] = 1 + K[P] + K^2[P]^2 + K^3[P]^3 + K^4[P]^4 + \dots + K^{n-1}[P]^{n-1} \tag{d}$$

Restando la ecuación (c) de la ecuación (d):

$$[Pt]/[P] - K[Pt] = 1 - K^n[P]^n \tag{e}$$

Para n que tiende a infinito, y si $K[P] < 1$, tendremos una serie convergente y $K^n[P]^n$ será igual a 0. Así, la ecuación (e) se reduce simplemente a:

$$[Pt]/[P] - K[Pt] = 1 \tag{f}$$

Reordenando para despejar [P], tendremos que:

$$[P] = [Pt]/(1+K[Pt]) \tag{g}$$

Dividiendo (g) por [Pt], tendremos que la fracción de proteína en la forma monomérica (fm) dependerá de la concentración de proteína total [Pt] según la siguiente ecuación:

$$[P]/[Pt] = f_m = 1/(1+K[Pt]) \tag{h}$$

Y la fracción de proteína oligomérica (fo) será:

$$f_o = 1 - f_m = 1 - 1/(1+K[Pt]) = K[Pt]/(1+K[Pt]) \tag{i}$$

2.b) Conformación de la región central de apoA-I en el estado unido a membranas

Con el fin de detectar las posibles modificaciones en el entorno de los Trp de estas mutantes cuando se unen a membrana, se estudió el espectro de fluorescencia de las distintas variantes en presencia de vesículas unilamelares de POPC más 20% de colesterol (ver materiales y métodos). Se trabajó con una concentración de lípidos de 2.5 mM y concentración de proteína de 0.04 mg/ml. Como se mencionó, en estas condiciones apoA-I se une a las vesículas sin producir su micelización o formación de complejos discoidales. Los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

	Intensidad (UA)		λ_{\max} (nm)	
	Libre de lípidos	Con vesículas	Libre de lípidos	Con vesículas
W@93	2.33	1.25	332	339
W@104	0.62	0.79	343	341
W@108	3.11	3.30	332	334

Tabla IV-4: datos de intensidad de fluorescencia de las mutantes de apoA-I en presencia y ausencia de lípidos. La mutante 104 posee una menor intensidad porque se debió disminuir la ganancia del equipo.

Se puede observar de la longitud de onda de los máximos de emisión, que el entorno de los Trp de los mutantes W@104 y W@108 prácticamente no se ve modificado por el agregado de vesículas. En ambas condiciones (con o sin vesículas), el residuo 104 se encuentra en un entorno relativamente más polar que el residuo 108.

El agregado de vesículas, sin embargo, resultó en un notable corrimiento hacia el rojo de la emisión del Trp de W@93, lo que puede ser asociado con un cambio a un entorno más polar en el estado unido a membrana. Evidentemente, este residuo no interactúa directamente con la región hidrofóbica de la membrana, aunque sí podría hacerlo con los grupos polares de los fosfolípidos.

Con la mutante W@93 también se observa una notable disminución en la intensidad de emisión de su Trp por el agregado de las vesículas. En gran parte, esto es esperable del entorno más polar indicado por el corrimiento al rojo, aunque no es posible descartar que también ocurra un incremento en homotransferencia de energía en el estado unido a membrana. Lamentablemente, mediciones de anisotropía como las

usadas para detectar homotransferencia en los oligómeros en solución acuosa, son muy complicadas y afectadas por un gran margen de error en presencia de vesículas debido a la turbidez de las mismas. Por tal razón no nos fue posible determinar si existe o no homotransferencia Trp-Trp en el estado unido a membrana de W@93.

En el caso de W@104 y W@108, se detecta en cambio un leve aumento en la intensidad de fluorescencia respecto al estado libre. Esto podría atribuirse a un mayor rendimiento cuántico por la interacción con lípidos, ó en el caso del W@104, a un alejamiento relativo intermolecular respecto al que presentaba en el estado libre. Así, se puede concluir que la formación de dímeros u oligómeros de estas mutantes en el estado unido a membrana no resulta en homotransferencia de energía como ocurre para la oligomerización en solución.

Así, estos datos indican que al menos la hélice 3 sufre una reorganización, aunque no es posible determinar si en este caso ocurre algún cambio en la distancia entre los residuos 93 entre los dímeros en solución acuosa y los dímeros de membrana. Esta reorganización podría involucrar a la hélice 4, pudiendo por lo tanto esta región estar involucrada en la formación del estado oligomérico detectado mediante cross-linking en la unión de la apo a membranas.

2.c) Topología de inserción en la membrana de las hélices Y centrales. Mediciones de extinción de la fluorescencia de Trp por extinguidores (quenchers) paramagnéticos localizados a diferente profundidad en la bicapa lipídica

Con el objeto de distinguir entre los dos modos de inserción en la membrana del par de hélices 3-4 que se plantearon (ver sección Objetivos), se procuró información sobre la profundidad en la que se localizan en la bicapa lipídica los residuos Trp de las mutantes W@93, W@104 y W@108. Para ello se determinó la eficiencia de extinción (quenching) de la fluorescencia del Trp de cada mutante por vesículas fosfolipídicas conteniendo una serie de análogos de fosfatidilcolina con un grupo paramagnético en el grupo polar (Tempo-PC), o en diferentes posiciones de la cadena hidrocarbonada (n-doxil-PC, donde n=5, 10 o 14). Aunque en membranas en el estado fluído tanto el grupo polar como las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos son bastante flexibles, la localización promedio de los grupos paramagnéticos extinguidores será bien superficial (en la región de los grupos polares para Tempo-PC), y con mayor profundidad en la región hidrocarbonada a medida que aumente "n" en los n-doxil-PC. Como la extinción

de la fluorescencia por estos grupos paramagnéticos depende de su aproximación al estado excitado del fluoróforo (en este caso los Trp), la probabilidad de extinción será máxima si la profundidad en la que se localiza el residuo Trp en la membrana coincide con la del grupo paramagnético. Otra sonda paramagnética utilizada en estos experimentos fué el análogo de colesterol 3- β -Doxil-colestano, el que nos podría informar sobre la existencia de alguna interacción preferencial de las hélices centrales de apoA-I con colesterol.

Se prepararon vesículas unilamelares conteniendo POPC/colesterol (4/1 en mol), o conteniendo POPC/colesterol/SL (3/1/1 en mol, donde SL es Tempo-PC, 5-, 10- o 14-doxil-PC, o a una relación 4/SL-C cuando SL es 3- β -Doxil-colestano. Los espectros de emisión de las mutantes W@93, W@104 y W@108 (a una concentración de 0,1 mg/ml) fueron registrados entre 310 y 550 nm en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de cada tipo de vesículas unilamelares. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, con una resolución de 8 nm en excitación y emisión. Todas las medidas se realizaron en un espectrofluorómetro SLM4800 con cubetas de 0,2 cm de paso óptico en excitación y 1 cm en emisión. El medio consistió de buffer fosfato sódico 25 mM pH 7,4 y la temperatura fue controlada en 25 °C.

Luego de corregir los espectros por la señal de scattering debida a las vesículas, así como por el filtro interno producido por las mismas, la intensidad fue estimada por la integración de los espectros entre 315 y 380 nm. En la figura IV-23 se muestran estos valores de intensidad normalizados por el valor obtenido en ausencia de vesículas.

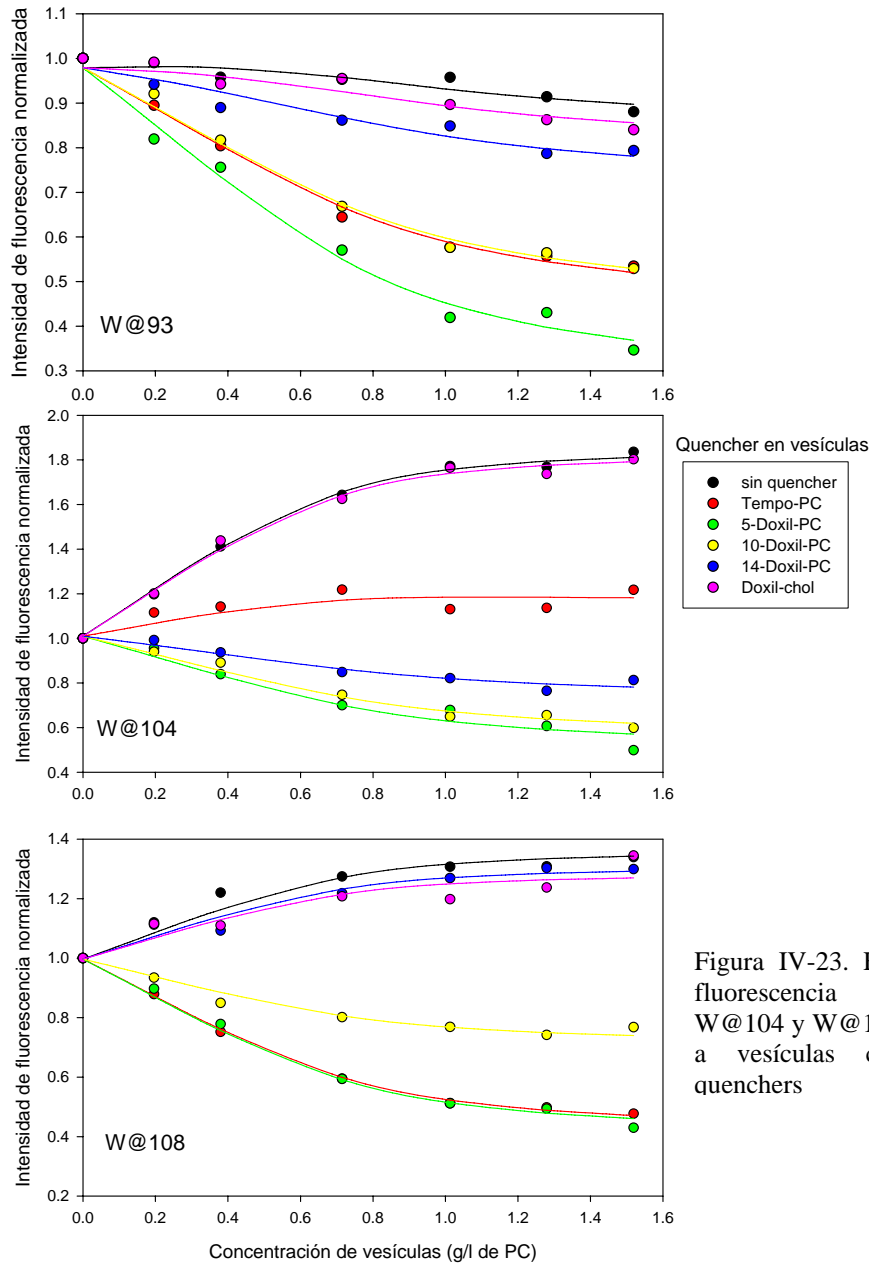


Figura IV-23. Extinción de la fluorescencia de W@93, W@104 y W@108 por la unión a vesículas con diferentes quenchers

Tal como se observó en el experimento descrito en el punto anterior, esta figura muestra claramente que en ausencia de quencher la intensidad de fluorescencia de W@93 disminuye por el agregado de vesículas, mientras que aumenta considerablemente para W@104 y W@108. También puede observarse que la presencia de 3- β -Doxil-colestano en las vesículas prácticamente no tiene efecto sobre la intensidad de fluorescencia de ninguna de las 3 mutantes estudiadas. En cambio, la presencia en las vesículas de Tempo-PC o de los n-doxil-PC afecta de manera diferencial a la fluorescencia de las mutantes. Para la mutante W@93, la eficiencia de quenching sigue el orden: 5-Doxil-PC > Tempo-PC \approx 10-Doxil-PC > 14-Doxil-PC. Para

W@104 el orden fue: 5-Doxil-PC \approx 10-Doxil-PC > 14-Doxil-PC > Tempo-PC; mientras que para W@108 fue: Tempo-PC \approx 5-Doxil-PC > 10-Doxil-PC > 14-Doxil-PC. La simple inspección de estos datos indica que el Trp de W@93 se localiza en la bicapa lipídica a una profundidad aproximadamente similar a la del 5-Doxil-PC, mientras que el Trp de W@104 está localizado a mayor profundidad (aproximadamente entre 5- y 10-Doxil-PC) y el Trp de W@108 más superficialmente (aproximadamente entre Tempo-PC y 5-Doxil-PC).

La localización de los residuos Trp de una proteína o péptido en una bicapa lipídica puede ser estimada con bastante precisión mediante el método "Parallax" desarrollado por Chattopadhyay y London (Chattopadhyay and London, 1987) y que se describe más abajo. Para poder aplicar este método a la situación actual, es necesario previamente estimar la intensidad de fluorescencia relativa (tanto en ausencia como en presencia de los "quenchers") cuando el 100% de la proteína está unida a las vesículas. Esto es, se necesita extrapolar los datos de la figura IV-23 a concentración infinita de vesículas. Teniendo en cuenta que la unión de la proteína a las vesículas afectará al equilibrio monómero-oligómero, puede asumirse que la intensidad de fluorescencia normalizada total (F_n) sigue la relación:

$$F_n = f_b F_{eb} + f_m F_{em} + f_o F_{eo}$$

$$o \quad F_n = f_b F_{eb} + f_m F_{em} + (1-f_b-f_m) F_{eo} \quad (g)$$

donde f_b es la fracción de proteína unida a membrana, f_m es la fracción de proteína libre en estado monomérico y f_o la fracción de proteína libre en estado oligomérico. F_{eb} , F_{em} y F_{eo} son respectivamente las intensidades de fluorescencia específicas (o por unidad de concentración) para la proteína unida a membrana, monomérica y oligomérica.

Para la distribución de la proteína libre en solución entre monómeros y oligómeros se asumió el tercer modelo de los utilizados en la interpretación de los datos de la sección 2a (figura 11), aunque teniendo en cuenta que sólo una fracción de la proteína total (igual a $1-f_b$) interviene en este equilibrio. Así, f_m estará dado por:

$$f_m = (1-f_b)/(1+K [Pt] (1-f_b)), \quad (h)$$

donde K es la constante de equilibrio para el proceso de oligomerización en solución ya definida en la sección 2a y apéndice I.

Considerando un equilibrio simple para la unión de la proteína a las vesículas, f_b estará dada por la solución con sentido físico de:

$$f_b = \frac{(K_d + P_t + N \cdot V_t) \pm \sqrt{(K_d + P_t + N \cdot V_t)^2 - 4 \cdot (P_t \cdot N \cdot V_t)}}{2 \cdot P_t} \quad (i)$$

donde K_d es la constante de disociación, P_t es la concentración de proteína total, N es el número de sitios de unión por unidad de concentración de lípido, y V_t es la concentración de vesículas.

La combinación de las ecuaciones g), h) e i) fue ajustada mediante regresión no lineal a los datos experimentales mostrados en la figura IV-23. Para ello, el valor de la constante de equilibrio del proceso de oligomerización (K), así como los valores correspondientes a la fluorescencia específica de monómeros (F_{em}) y oligómeros (F_{eo}) en solución fueron fijados en los valores que se obtuvieron del experimento descrito en la sección 2a (fig IV-22) y que se indican en la tabla 5. Con estos parámetros fijos, el ajuste a los datos de la figura IV-23 permitió estimar los valores de F_{eb} en ausencia y presencia de los distintos quenchers, así como también el valor de la constante de disociación (K_d) y el número de sitios por unidad de concentración de lípido (N). El ajuste se realizó para estimar un único valor de K_d y N , asumiendo que éstos no son afectados por la presencia de los quenchers ni por las mutaciones en apoA-I. Los parámetros obtenidos son indicados en la tabla 5 y las funciones ajustadas están representadas por las líneas mostradas en la figura 12. Los valores obtenidos para K_d y N son del mismo orden que los obtenidos por Yokoyama (Yokoyama et al., 1980) para la unión de apoA-I a vesículas de PC de huevo / colesterol (4/1)

Tabla IV-5. Parámetros fijos usados en el ajuste no lineal de la combinación de las ecuaciones (g), (h) e (i) a los datos experimentales de la figura 12, y parámetros variables obtenidos de dicho ajuste. Los parámetros fijos se obtuvieron del ajuste de la combinación de las ecuaciones (a) y (f) a los datos de la figura IV-22 (ver sección 2a) previamente normalizados a un valor de 1 para $[Pt] = 0,1 \text{ g/l}$ (la que se usó en el experimento de fig IV-23)

Parámetros fijados			
Mutante		Fem	Feo
W@93		1,92	0,80
W@104		1,66	0,89
W@108		1,17	0,96
K ($\text{g}^{-1} \text{ l}$)		52,8	
Parámetros variables obtenidos del ajuste			
Mutante	Tipo de quencher en vesículas	Feb	Eficiencia de quenching (F/Fo)
W@93	sin quencher	$0,824 \pm 0,018$	
W@93	Tempo-PC	$0,409 \pm 0,027$	0,497
W@93	5-doxil-PC	$0,242 \pm 0,030$	0,294
W@93	10-doxil-PC	$0,419 \pm 0,026$	0,508
W@93	14-doxil-PC	$0,696 \pm 0,021$	0,845
W@93	Doxil-colestano	$0,779 \pm 0,019$	0,945
W@104	sin quencher	$1,847 \pm 0,025$	
W@104	Tempo-PC	$1,155 \pm 0,015$	0,625
W@104	5-doxil-PC	$0,482 \pm 0,024$	0,261
W@104	10-doxil-PC	$0,536 \pm 0,023$	0,290
W@104	14-doxil-PC	$0,714 \pm 0,020$	0,386
W@104	Doxil-colestano	$1,826 \pm 0,024$	0,988
W@108	sin quencher	$1,366 \pm 0,018$	
W@108	Tempo-PC	$0,406 \pm 0,023$	0,297
W@108	5-doxil-PC	$0,395 \pm 0,023$	0,289
W@108	10-doxil-PC	$0,702 \pm 0,018$	0,514
W@108	14-doxil-PC	$1,310 \pm 0,017$	0,959
W@108	Doxil-colestano	$1,285 \pm 0,017$	0,941
Kd ($\text{g}^{-1} \text{ l}$)		$0,0125 \pm 0,004$	
N (mol prot / mol PC)		$0,127 \pm 0,006$	

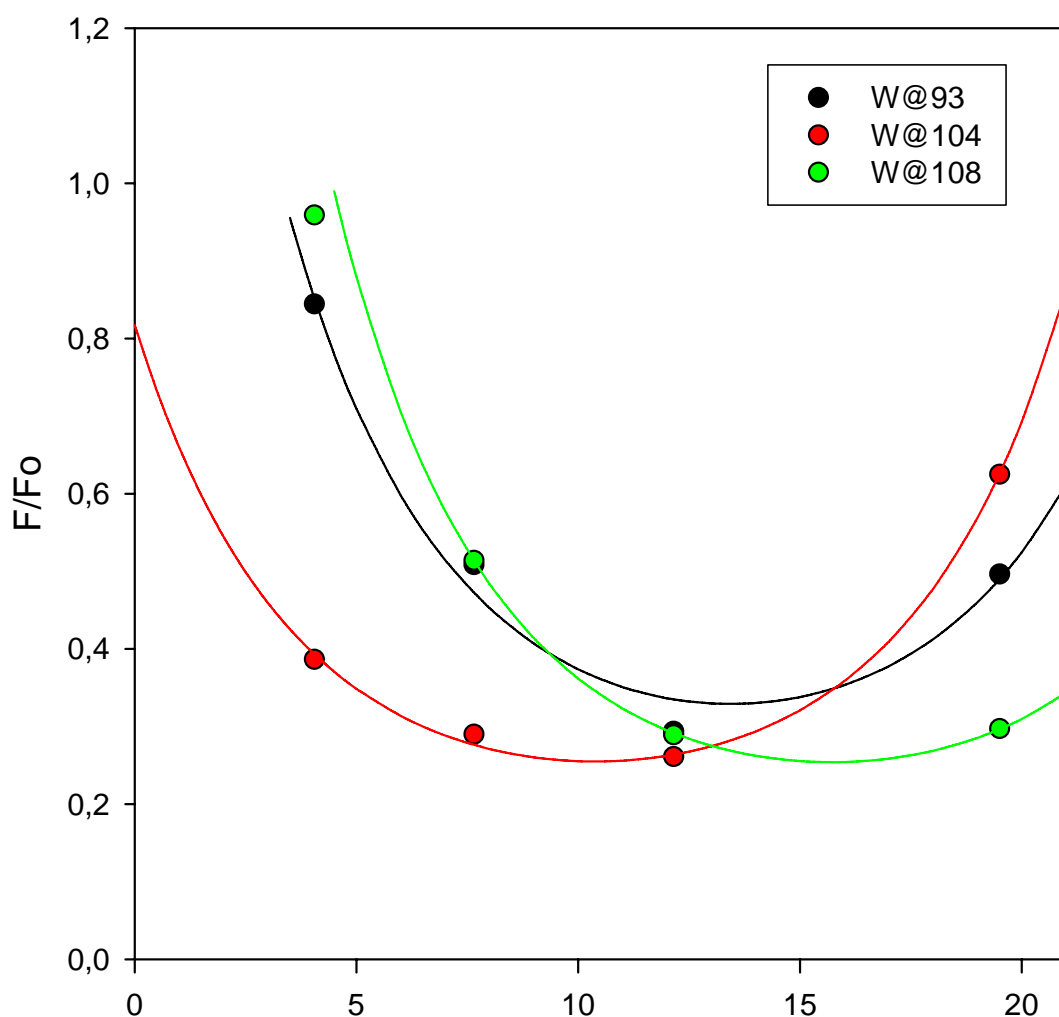
De los valores fluorescencia específica para la proteína unida a membrana (Feb), se estimaron las eficiencias de quenching por la relación de Feb en presencia del quencher a aquella en ausencia del mismo (F/Fo), datos que también se indican en la

tabla 5. Estos valores fueron entonces utilizados para estimar la profundidad a la que se localizan los residuos Trp de las mutantes en la bicapa lipídica mediante el método de Parallax. Según Chattopadhyay y London (Chattopadhyay and London, 1987), F/F_0 está determinado por:

$$F/F_0 = e^{-\pi C ((Lc-Zc)^2 + X^2 - Rc^2)} \quad \text{para } (X^2 + (Lc-Zc)^2)^{1/2} \leq Rc \quad (j)$$

donde Rc es el radio del círculo alrededor del quencher paramagnético en el que la extinción de fluorescencia es efectiva, X es la distancia lateral mínima a la que fluoróforo y quencher pueden aproximarse, Lc y Zc son las distancias del centro de la bicapa lipídica en la que se ubican el quencher y el fluoróforo respectivamente, y C es la concentración de quencher en moléculas por unidad de área. Esta relación se cumplirá siempre que la distancia entre fluoróforo y quencher sea menor al radio crítico Rc , en caso contrario no existirá quenching y F/F_0 será igual a 1. En el caso en que no exista restricción para el acercamiento lateral entre fluoróforo y quencher (como sería de esperar en el caso que los Trp se encuentren totalmente expuestos a los lípidos de la membrana), X será igual a 0.

En cualquier caso, es necesario conocer los valores de Rc (o Rc y X) para poder estimar la profundidad de localización del fluoróforo (Zc) conociendo la localización del quencher (Lc) y su eficiencia de quenching. Una solución generalmente utilizada para independizarse de Rc (y X) es usar la relación de eficiencia de quenching obtenida por dos quenchers de diferente localización como fue descrito por Chattopadhyay y London (Chattopadhyay and London, 1987). Otra estrategia que utilizamos aquí fue ajustar por regresión no lineal la ecuación (j) a los datos experimentales obtenidos con todos los quenchers. Esto permitió la estimación directa de los valores de $X^2 - Rc^2$ (o de Rc si se asume $X=0$). También esta estrategia permite independizarse de conocer con precisión la concentración del quencher por unidad de área, la que no es simple de estimar en sistemas de mezclas de fosfolípidos con colesterol debido al efecto condensante de este último. En la figura IV-24 se muestran los datos de F/F_0 en función de la distancia del quencher al centro de la bicapa para las tres mutantes. Sólo los datos de Doxil-colestano fueron omitidos del análisis ya que no hay en la literatura estimaciones precisas de su localización en la membrana. Las líneas de la figura IV-24 representan las funciones ajustadas, y los parámetros obtenidos del ajuste son indicados en la tabla IV-6.



Posición del quencher (angstroms desde el centro de la bicapa)

Figura IV-24. Dependencia de la eficiencia de extinción de la fluorescencia de las mutantes W@93, W@104 y W@108 por quenchers localizados a diferente profundidad en la bicapa lipídica. Los puntos son los valores de F/F_0 de la tabla 6 graficados en función de la localización del quencher. Las líneas son el representan la función (j) ajustada a los datos experimentales.

Tabla IV-6: Estimaciones de la profundidad de localización en la bicapa lipídica de los Trp de W@93, W@104 y W@108 usando ajuste por regresión no lineal de la ecuación (j) a los datos de figura IV-24.

Parámetros conocidos:					
Distancia de los quenchers del centro de la bicapa en angstroms (Lc) ^(a)					
Tempo-PC	5-doxil-PC	10-Doxil-PC	14-doxil-PC		
19,5	12,15	7,65	4,05		
Parámetros estimados:					
Mutante	C ^(b) (moléculas/Å ²)	Zc (Å)	X ² -Rc ² ^(c) (Å ²)	Rc ^(d) (Å)	X ^(e) (Å)
W@93	0,0034±0,0003	13,43±0,28	102,9±6,7	10,14±0,33	6,4
W@104		10,38±0,32	126,5±8,8	11,25±0,39	4,2
W@108		15,72±0,53	126,9±11,8	11,26±0,52	4,1

(a) El valor de Lc para Tempo-PC fue tomado del trabajo de Chattopadhyay y London. Los valores para 5- y 10-doxil-PC fueron los reportados por los mismos autores (Chattopadhyay and London, 1987). El valor de Lc para 14-Doxil-PC se estimó considerando que la distancia al centro de la bicapa disminuye en 0,09 nm por cada átomo de C como fue también reportado por estos autores

(b) El análisis por regresión se realizó conjuntamente a los datos de todas las mutantes y quenchers, lo que permitió estimar la concentración de quencher (C) asumiéndola idéntica para todas las muestras.

(c) Los valores de X²-Rc² fueron estimados directamente por la regresión.

(d) Los valores de Rc indicados fueron obtenidos asumiendo que no hay restricción para el acercamiento lateral entre el quencher y los Trp (esto es X=0).

(e) Los valores indicados para X se obtuvieron asumiendo para Rc un valor de 12 Å como reportado para estos quenchers (Chattopadhyay and London, 1987)

La concentración de quencher por unidad de área (C) obtenida del ajuste concuerda bastante bien con la que puede ser estimada considerando la relación molar de quencher usada en el experimento y un área molecular para la PC algo condensada por la presencia del colesterol. Los valores de X²-Rc² obtenidos también están en el rango esperado de acuerdo a los datos de la literatura (Chattopadhyay and London, 1987). Es de notar, sin embargo, que el valor que se obtuvo para la mutante W@93 es sensiblemente menor que el obtenido para las otras dos mutantes. Cómo para un dado

par de quencher-fluoróforo no hay motivos aparentes para que R_c no se mantenga constante, es razonable atribuir éste cambio a una diferente accesibilidad lateral del quencher al fluoróforo que es muy factible de ocurrir en proteínas. En la tabla 6 se muestra una estimación de los valores de X asumiendo un valor razonable (de 12 Å) para R_c . Aunque estos datos distan mucho de ser precisos debido a la imposibilidad de estimar ambos parámetros independientemente, indican un menor grado de accesibilidad de los quenchers al Trp de W@93 que a los Trp de las otras dos mutantes. Esto concuerda con la observación (ver sección 2b) que la emisión del Trp de W@93 presenta un corrimiento al rojo y una disminución en rendimiento cuántico cuando esta proteína se encuentra en la membrana. Ambos datos sugieren que el Trp de esta mutante se encuentra relativamente menos accesible al entorno lipídico que los Trp de W@104 y W@108.

Independientemente de la accesibilidad lateral, los datos de la tabla IV-6 descartan que las hélices 3 y 4 de apoA-I se inserten en la membrana con su eje largo paralelo a la superficie de la membrana. Estos datos indican una localización más bien superficial para el residuo 108, mientras que el residuo 104 se localiza más profundamente, y a una distancia de aproximadamente una vuelta de hélice del residuo 108. Esto indica fuertemente que la hélice 4 de apoA-I se inserta en la membrana con su eje prácticamente perpendicular a la superficie de la bicapa lipídica.

Por otro lado, el residuo 93 de la hélice 3 se localiza a una profundidad intermedia entre los residuos 104 y 108 de la hélice 4 vecina, lo que indica que existe un giro, muy probablemente alrededor de prolina 99, separando ambas hélices; y que la hélice 3 se encuentra también perpendicular a la superficie de la membrana y antiparalela a la hélice 4.

2.d) Configuración de apoA-I en complejos lipoproteicos discoidales. Evidencias de que la configuración es dependiente del método de reconstitución

La formación de complejos discoidales de apoA-I con fosfolípidos es muy eficiente cuando, como se mencionó previamente, la apoA-I interacciona con membranas multilamelares de determinados fosfolípidos como DMPC a la temperatura de transición de fase. Esto resulta en una rápida micelización y formación de partículas discoidales, cuyo tamaño depende de la relación inicial de lípidos a proteína (Li et al., 2004). El inconveniente de este método es que puede ser aplicado a unos pocos fosfolípidos que sufren la transición de fase a temperaturas superiores al punto de fusión del agua e inferiores a la temperatura en que la proteína desnatura. Otra forma muy difundida de obtener complejos discoidales es por medio de la técnica de diálisis con detergente como colato de sodio (Matz and Jonas, 1982a). Para ello se obtienen vesículas multilamelares de un fosfolípido o mezclas de ellos, se las incuban con un detergente fácilmente dializable como el colato de sodio, y por último se incuban con la apoA-I ó con cualquiera de sus mutantes. Al eliminar el detergente por diálisis, se forman los discos de composición lipídica similar a la de las vesículas iniciales (Jonas et al., 1989).

Una pregunta planteada en este trabajo, fue si estos dos procedimientos resultan en la misma configuración de apoA-I en los complejos discoidales. Este interrogante es de gran importancia, ya que estas partículas se utilizan como modelos de las HDL discoidales naturales, las que como se mencionó juegan un rol primordial en la etapa inicial del transporte reverso de colesterol (pre β HDL). Por la literatura presente, no quedan dudas respecto a que existen al menos 2 moléculas de apoA-I por complejo y los modelos más ampliamente aceptados indican que éstas se ubican con el eje mayor de las hélices perpendicular a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (Silva et al., 2005b). Con el fin de responder esta pregunta, se prepararon y analizaron complejos lipoproteicos por medio de las dos técnicas, utilizando ya sea mutantes de Trp único ó la apoA-I obtenida de suero. Para la técnica de reconstitución por micelización a la T_m , se incubó apoA-I con DMPC por 8 hs a 24 °C a una relación molar ya sea de apoA-I ó de sus mutantes respecto a lípidos de 1/40; los discos formados con colato fueron preparados a una relación molar proteína/lípido/colato de 1/40/60, preparando primero las vesículas multilamelares de DMPC, luego incubando con colato a 4 °C, agregándose finalmente la apoA-I o sus mutantes, para luego dializarlo contra buffer fosfato 25 mM

pH 7.4.. Por último a los discos formados por estas dos técnicas se los sometió a cuatro ciclos de una hora cada uno, a las temperatura de 20-24-37 °C (una hora a cada temperatura x 4 veces) Como en primera instancia se obtienen poblaciones de partículas con la misma cantidad de proteína pero de diferente cantidad de lípidos el objetivo de esta etapa es lograr con los ciclos de temperaturas, obtener tamaños de discos que dependan solamente de la relación Lip/Prot.(Li et al., 2004); esto también se puede lograr incubando las partículas durante 7 días a 4 °C. En todos los casos la concentración final de apoA-I ó W@n fue de 0.2 mg/ml.

La conformación de la proteína en los complejos reconstituidos por los diferentes métodos mencionados se analizó mediante dos diseños experimentales: 1) mediante fluorescencia, determinando la eficiencia de homotransferencia de energía entre los residuos Trp de ambas proteínas en cada partícula, en los complejos formados con W@n (donde n= 104 ó 108). La eficiencia de transferencia se detectó midiendo la anisotropía de fluorescencia excitando a 295 nm. 2) Mediante espectrometría de masa: en este caso se reconstituyeron partículas usando apoA-I sérica, se hicieron reaccionar con un agente entrecruzante hidrófobico específico para grupos aminos, el Dithiobis (succinimidyl)propionate (DSP) por 20 minutos a temperatura ambiente a una relación molar 10/1 croslinker/apoA-I e interrumpiendo la reacción con buffer Tris 1M pH 7,4. Luego se deslipidizó con guanidina, se separaron los monómeros de dímeros por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) y se tripsinizaron. Una alícuota del tripsinizado se separó por HPLC (cromatografía líquida de alta performance) de fase reversa y otra se analizó por medio de espectrometría de masa MALDI-TOF (del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) en el Department of Biochemistry & Molecular Biology, Oklahoma State University.

Los estudios de fluorescencia de los discos reconstituidos con los mutantes puntuales de Trp son resumidos en la tabla IV-7:

	λ max (nm)	Intensidad Relativa	Anisotropía ($\lambda_{ex.295}$ nm)
W@104 s/líp. W@108 s/líp.	345 339	600 1750	0.069 0.086
W@104/DMPC/colato W@108/DMPC/colato	341 338	2332 4196	0.117 0.116
W@104/DMPC W@108/DMPC	341 340	1447 1868	0.017 0.049

Tabla IV-7: características de espectros de fluorescencia de partículas dicoidales obtenidas por dos técnicas diferentes

Se puede observar que el entorno del residuo de Triptofano en la posición 108 no sufre cambios significativos en las partículas discoidales formadas por las dos técnicas respecto al estado libre. En cambio el Trp 104 se encuentra más protegido del medio acuoso al unirse a lípidos.

Se observa también una notoria disminución en intensidad y anisotropía de Trp 104 y Trp 108 en discos preparados por reacción directa en comparación con aquellos preparados con colato, atribuyéndose este fenómeno a homotransferencia de energía de resonancia (Trp-Trp), por lo que los datos sugieren que el arreglo de apoA-I en los discos depende del método de reconstitución e indican una menor distancia promedio entre las hélices 4 de las dos moléculas de apoA-I cuando los discos son preparados por reacción espontánea con vesículas de DMPC.

Como se mencionó arriba, otra forma de estudiar la conformación de la apo en complejos reconstituidos fue mediante el uso de agentes entrecruzantes y tripsinolisis de la apoA-I nativa. Una vez reconstituidas las partículas por ambos métodos se analizaron por gel en condiciones nativas (fig. IV-25)

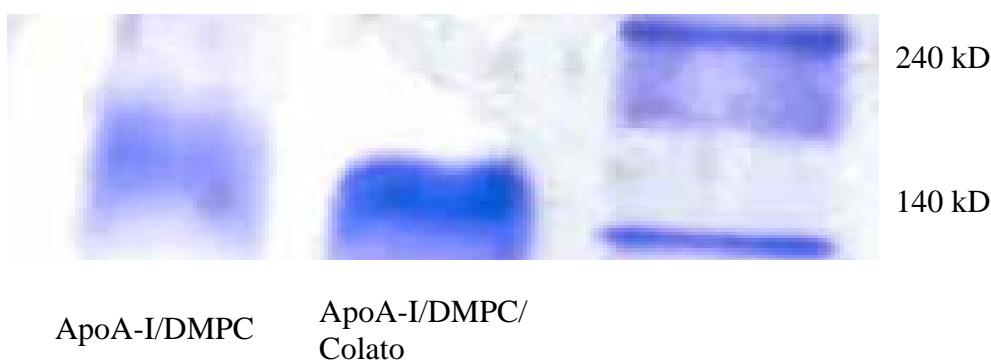


Fig. IV-25: Gel nativo en gradiente 4-24% de partículas de dHDL

Se ve en el gel que el tamaño de las partículas es similar cuando son utilizadas las mismas relaciones fosfolípidos/ proteínas.

Estas partículas fueron tratadas con el agente entrecruzante lipofílico DSP, y posteriormente se verificó la obtención de dímeros por electroforesis en gel de SDS-PAGE 12%

60kD

← Dímeros de ApoA-I

ApoA-I/DMPC

ApoA-I/DMPC/Colato

Fig. IV-26: Gel de SDS-PAGE en donde se muestra los dímeros de apoA-I obtenidos a partir de las diferentes tipos de partículas por entrecruzamiento covalente con el reactivo DSP.

Como se menciona mas arriba los dímeros fueron separados por FPLC y Tripsinizados, una alícuota de cada muestra fue resuelta por HPLC en gradiente de agua/aceto-nitrilo (90-10% a tiempo cero a 10-90% a los 60 minutos en agua aceto-nitrilo, el flujo utilizado fue de 500µl/min) observándose que los perfiles de elusión de las mismas no fueron iguales (Fig.IV-27a y IV-27b). Si bien todos los picos observados en la muestra correspondiente a los discos preparados por la reacción directa también se detectan en la muestra de los discos preparados por diálisis con colato, en esta última también se observan varios picos adicionales.

Fig. IV-27a: Perfil de elución en HPLC (por DO a 220 nm) luego de la tripsinolisis de los dimeros obtenidos a partir de los diferentes tipos de partículas discoidales

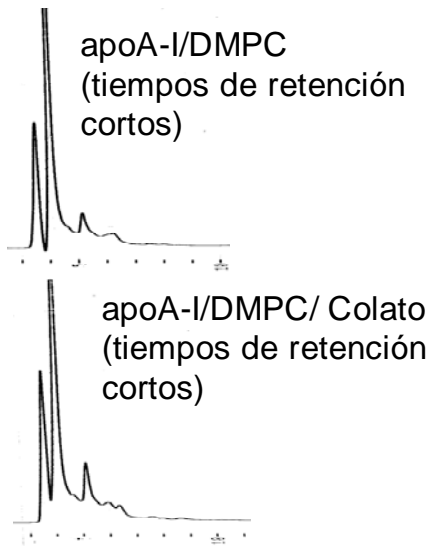
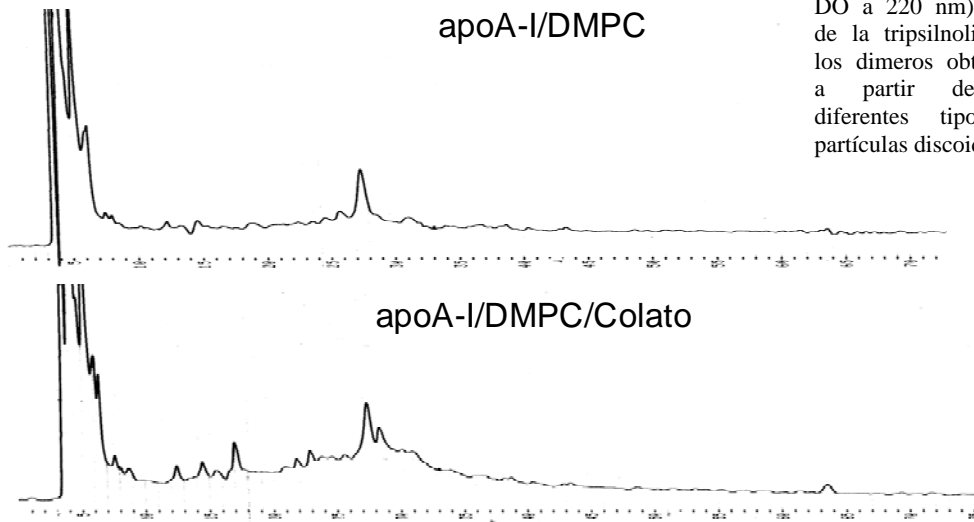


Fig.IV-27b: analisis a tiempos de retención cortos detectados con mayor resolución que la figura anterior de los productos de tripsinolisis

El análisis del producto de tripsinolisis por MALDI-TOF rindió resultados similares a los encontrados en los perfiles de HPLC en lo que respecta a que se obtienen péptidos a partir de apo en las partículas formadas con colato que no se obtienen cuando las partículas son formadas por interacción directa. (ver fig. IV-28a, IV-28b).

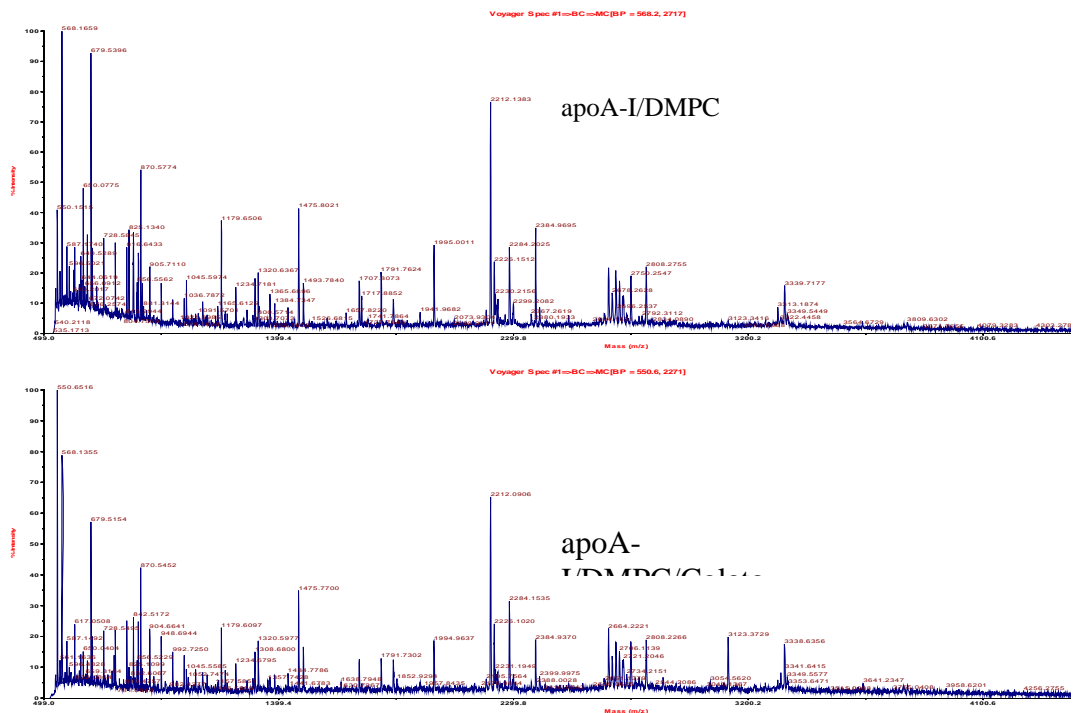


Fig. IV-28a: analisis de los pesos moleculares de los péptidos obtenidos de los productos de tripsinólisis de los dimeros provenientes de los discos formados por las dos técnicas mencionadas

Al hacer la diferencia de los espectros se observan marcadamente la presencia de picos distintivos en la muestra con colato.

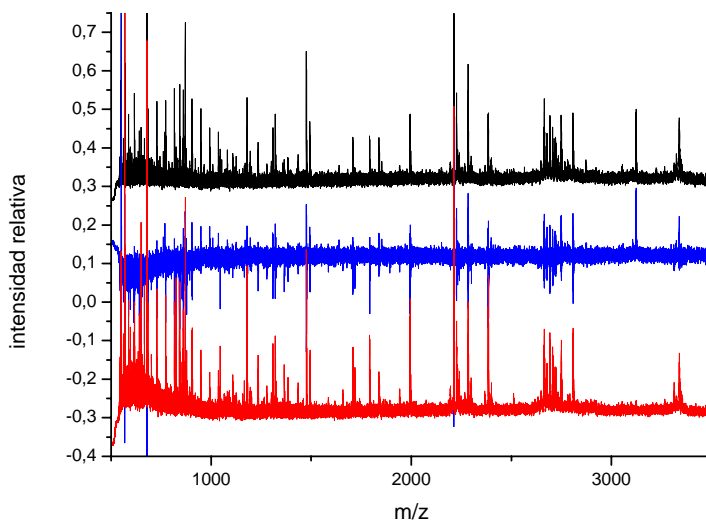


Fig.IV-28b: diferencia de los pesos moleculares de los péptidos obtenidos de discos formados por las dos técnicas: en negro, los obtenidos con colatos; rojo: obtenidos por micelización directa; y en azul la diferencia

Tanto los resultados de los experimentos con el agente entrecruzante como los obtenidos por los estudios de fluorescencia con las mutantes W@104 y W@108 indican claramente que la configuración de la apoA-I en los discos resultantes de la reacción directa con vesículas de DMPC a la temperatura de transición difiere de aquella en los discos que resultan por diálisis con colato.

Las HDL discoidales reconstituídas con colato, tanto de apoA-I como de otras apolipoproteínas intercambiables, han sido extensivamente estudiadas por diferentes técnicas. En varios de estos estudios se ha detectado la coexistencia de configuraciones alternativas. En base a resultados de mediciones de distancias por transferencia de energía en mutantes con inclusión de un residuo de cisteína y específicamente marcadas con fluoróforos, Tricerri y colaboradores (Tricerri et al., 2001) propusieron el modelo de la hebilla (ver Introducción). Los datos, sin embargo, no pueden ser compatibilizados con una configuración única, por lo que estos autores propusieron la coexistencia de dos configuraciones de la hebilla (cabeza-cabeza y cabeza-cola). En discos de apolipoproteína III preparados de la misma manera, Garda y col. (Garda et al., 2002) también detectaron la coexistencia de al menos dos configuraciones. Más recientemente, mediante el mapeo de los residuos de lisina cercanos entre sí usando agentes entrecruzantes, Silva y colaboradores (Silva et al., 2005b), (Davidson and Silva, 2005) también detectaron dos configuraciones coexistentes en discos de apoA-I, aunque en este caso soportando el modelo del "doble cinturón" (ver Introducción) con las dos moléculas de apoA-I completamente extendidas sobre el borde del disco y antiparalelas entre sí. En una de estas configuraciones (denominada 5/5), quedan enfrentadas las hélices 5 de cada molécula de apoA-I. En la otra (llamada 5/2), la hélice 5 de una molécula queda enfrentada a la hélice 2 de la segunda molécula de apoA-I.

Los resultados presentados en este capítulo sugieren que a diferencia de los discos preparados por diálisis con colato, aquellos que se generan por la reacción directa con DMPC en la temperatura de transición tendrían una única configuración en la que las hélices 4 de cada molécula de apoA-I se encuentran en estrecho contacto entre sí. Esto sería compatible tanto con la "hebilla cabeza-cabeza" como con el "doble cinturón 5/2".

Cómo se detalló anteriormente (sección IV-A), la unión de apoA-I a membranas lipídicas va acompañada de dimerización. Además, la interacción intermolecular entre las repeticiones helicoidales 3 y 4 parece ser importante tanto para la oligomerización en solución (sección IV-C-2b), como también para la dimerización en la membrana

como lo sugieren los experimentos con AI 77-120 (sección IV-A) No está aún resuelto si es el dímero de apoA-I en solución el que se une directamente a la membrana, o si alternativamente se une primero apoA-I monomérica que posteriormente dimeriza en la membrana. En cualquiera de los casos, sin embargo, es razonable asumir que la formación del dímero en la membrana sea un requisito previo para la reacción de micelización que resulta en la formación de los complejos discoidales. Esta dimerización previa por la interacción intermolecular entre las hélices centrales podría determinar que la proteína presente un única configuración (con las hélices centrales en estrecho contacto entre sí) en los discos resultantes. Esta restricción no existiría cuando los discos son preparados por el método de diálisis con colato, lo que permitiría que la proteína pueda adoptar más de una configuración en los discos (aquellas que se encuentren en un mínimo energético).

Si bien la configuración de apoA-I en las HDL naturales o generadas por la interacción de apoA-I con células no es conocida, estos resultados generan un margen de duda sobre la validez de usar a las HDL reconstituídas por diálisis con detergentes como modelo de las HDL naturales. La misma restricción existente para la generación de discos por la reacción con vesículas de DMPC a la temperatura de transición bien podría existir en el proceso de formación de HDL discoidales que es mediado por el transportador ABCA1 en las células, aunque la obtención de datos tendientes a resolver este problema requerirá de futuros estudios.

Cabe recordar que el péptido AI 77-120 no resultó eficiente para solubilizar lípidos a la T_m (y por ende en formar partículas lipídicas, pero en cambio formó partículas de alrededor de 67 kD, cuando se siguió el protocolo de la formación de discos por diálisis de colato (fig IV-6 sección IV-A).

Todos estos resultados apoyan la hipótesis (que será posteriormente analizada), de que la interacción de la apoA-I con membranas favorece la dimerización de la proteína a partir de su dominio central, y la posterior captación de fosfolípidos, los que puedan ser aceptores de colesterol.