

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

Introducción

La importancia de los lípidos para el funcionamiento celular es altamente reconocida. Los animales han desarrollado diferentes sistemas para la captación y remoción de lípidos de las células, y el transporte entre ellas. Estos sistemas incorporan de cientos a miles de moléculas de diferentes lípidos, como ser fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos y triglicéridos, estabilizadas en el medio acuoso por moléculas proteicas, denominadas en conjunto Lipoproteínas. A los componentes proteicos libre de lípidos de éstas últimas se los denomina apolipoproteínas.

Las lipoproteínas de los mamíferos, y principalmente del humano, pertenecen a cuatro clases principales, clasificándose por su densidad, HDL, LDL, VLDL (de las siglas en inglés High Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein, y Very Low Density Lipoprotein, respectivamente); cuanto mayor relación proteínas/lípidos, mayor es su densidad. La cuarta clase de lipoproteínas son los denominados Quilomicrones (Qn, son los Quilomicrones nacientes; Qr, los remanentes), provenientes de la dieta, en donde la cantidad de lípidos es la mayor. La Fig I-1 muestra el perfil de migración de las mismas obtenido dependiendo el método

Apolipoproteína	Peso molecular (en kD)	Concentración en plasma (gr/L)	Distribución
AI	28	1,0-1,4	HDL, Qn
AII	17	0,3-0,5	HDL, Qn
AIV	46	0,5-0,16	HDL, Qn
(a)	300-800	0,01-0,50	Lp(a)
B100	512	0,7-1,0	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)
B48	242	0,03-0,05	Qn, Qr
CI	7	0,04-0,06	Qn, VLDL, IDL, HDL
CII	9	0,03-0,05	Qn, VLDL, IDL, HDL
CIII	9	0,12-0,14	Qn, VLDL, IDL, HDL
D (AIII)	19	0,06-0,07	HDL
E	34	0,03-0,05	Qn, VLDL, HDL

Tabla I-1: resumen de las características de las apolipoproteínas humanas.

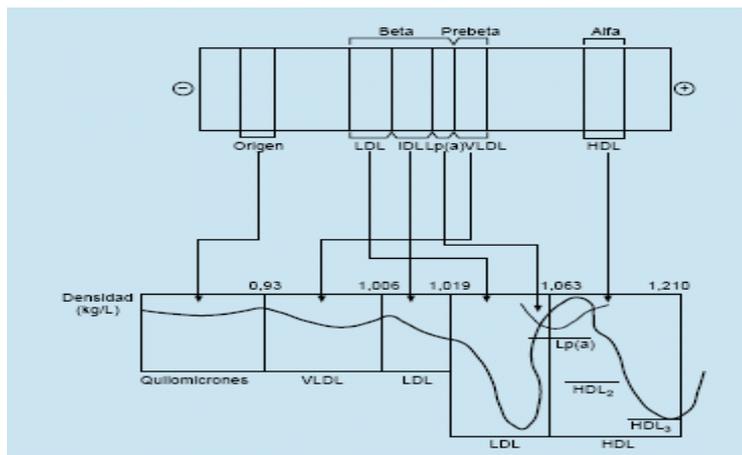


Fig. I-1: Arriba se muestra la movilidad de las lipoproteínas cuando se les aplica un campo eléctrico. Abajo: movilidad de las mismas en un gradiente de densidad.

Cada clase de lipoproteína tiene una composición lipídica, proteica y función diferente, inclusive dentro de cada clase pueden considerarse más de una población. Las diferentes apolipoproteínas confieren estructura a las partículas, promueven la interacción con enzimas y proteínas extracelulares, como así también promueven la interacción con membranas por medio de receptores. En la Tabla I-1 se resumen las características principales y las lipoproteínas en las que se encuentran.

La mayor parte de los lípidos ingeridos en la dieta, luego de ser emulsionados por las sales biliares son hidrolizados en la luz intestinal por la lipasa pancreática; los ácidos grasos de menos de 12 átomos de carbono pasan directamente a la circulación porta y son transportados unidos a albúmina por fuera de este sistema. Los ácidos grasos de mayor longitud en cambio se reesterifican uniéndose a grupos alcohólicos del glicerol ó también al colesterol, siendo rápidamente re-esterificados gracias a la acción de la enzima acilcoenzima A-colesterol-aciltransferasa (ACAT). Estos lípidos son transportados como partículas lipoproteicas denominadas Quilomicrones, y poseen las proteínas apoB48 principalmente, cantidades menores de apoA-I, apoA-II y apoA-IV, y trazas de apo CII, siendo secretadas a la linfa y luego transportadas al torrente sanguíneo; en circulación los Quilomicrones son remodelados por medio de la lipoproteinlipasa de los vasos sanguíneos, la cual hidroliza los triglicéridos, dando origen a pequeños Quilomicrones residuales, ricos en colesterol, los que son incorporados a las células hepáticas por medio de receptores. En la Fig. I-2 se muestra un esquema general de este proceso.

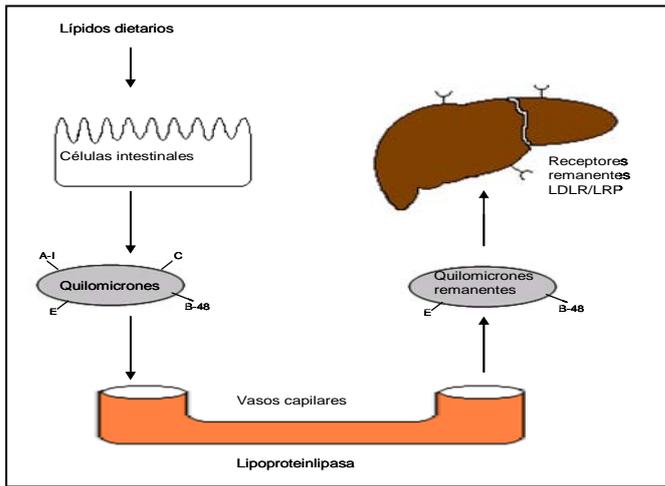


Fig. I-2: Se muestra la ruta metabólica de los lípidos ingeridos en la dieta

Las VLDL se originan a partir de los lípidos hepáticos sintetizados *de novo* ó recaptados a partir de otras lipoproteínas en circulación. Estas lipoproteínas también son metabolizadas por la acción lipoproteínlipasa, y al ir perdiendo lípidos (triglicéridos) se van transformando en partículas de mayor densidad, transformándose en IDL (Intermedial Density Lipoprotein), que al seguir su catabolismo son transformadas en LDL. Tanto las IDL como las LDL pueden ser eliminadas de la circulación mediante endocitosis mediada por receptores, que reconocen a las apoB100 y apoE. En el caso de las IDL, el reconocimiento de los receptores es mediado por la apoE, mientras que en la LDL es por medio de las apoB100 (Lodish et al., 2005) (ver esquema a continuación Fig. I-3).

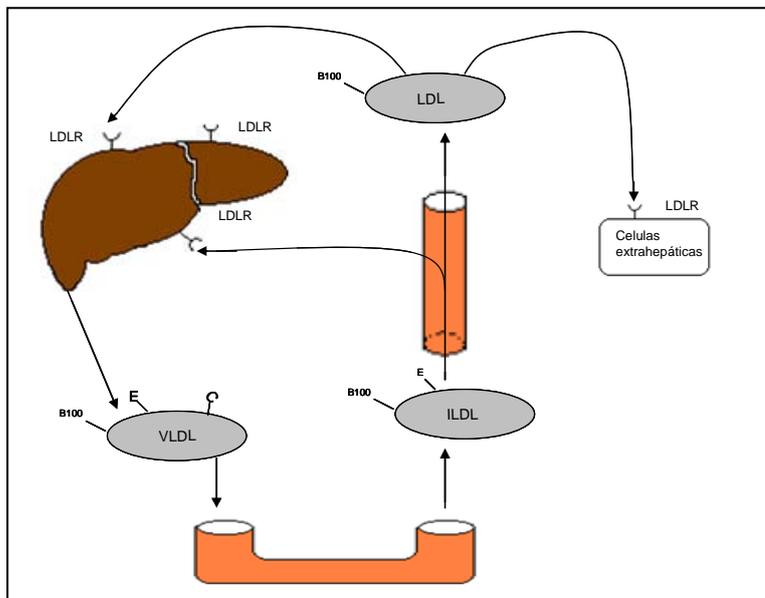


Fig. I-3: Metabolismo de VLDL

El metabolismo de estas partículas es de gran importancia, ya que transportan la mayor cantidad de colesterol plasmático hacia los tejidos periféricos, asociando su exceso con características aterogénicas.

Las células poseen receptores para las LDL e IDL, y la cantidad de colesterol celular modula negativamente la biosíntesis de colesterol *de novo* como así también la síntesis de receptores de membranas (Brown and Goldstein, 1986). Una vez unidas a su receptor, las partículas lipoproteicas son incorporadas a las células por endocitosis y la vesícula formada se fusiona a los lisosomas, cuyas enzimas degradan los distintos componentes de las partículas de LDL.

Los macrófagos poseen además receptores que reconocen LDL modificadas, a fin de eliminar del torrente sanguíneo lipoproteínas que sufren oxidaciones ó metilaciones. Existen en los macrófagos dos tipo de estos receptores, los que reconocen LDL acetiladas u oxidadas y las que reconocen las LDL oxidadas únicamente; ninguno de estos receptores es inhibido en su síntesis por el colesterol intracelular en su captación de colesterol y por lo tanto la sobre acumulación de esteroides transforma a estas células en las llamadas células espumosas, características de las lesiones ateromatosas (Brown and Goldstein, 1983)

Existe una segunda forma de incorporar colesterol desde las partículas en las células hepáticas y esteroideogénicas, principal lugar en donde se metabolizan las HDL, mediante la unión de las lipoproteínas a receptores de membrana llamados SR-BI (de scavenger receptor, clase B tipo I) y la incorporación se cree que es por una hemifusión de la partícula con la membrana plasmática, que resulta en una incorporación de los ésteres de colesterol a la membrana, transfiriéndose al lado citosólico desde donde son hidrolizadas por esterazas citoplasmáticas no lisosómicas (Lodish et al., 2005). Las partículas remanentes se disocian de su receptor y regresan a circulación, entrando en contacto nuevamente con membranas ú otras lipoproteínas.

Estos receptores difieren fundamentalmente de los receptores de LDL en dos aspectos, el primero en que se encuentran agrupados sobre microvellocidades y sobre “dominios balsa” de la superficie celular denominados “raft” y no en fosa de clatrina como en el caso de los receptores de LDL, y segundo, el SR-BI media la transferencia de lípidos a través de membrana y no por endocitosis (Lodish et al., 2005), (Martinez et al., 2004)

Los niveles de colesterol celular ejercen una serie de autorregulaciones para su homeostasis, como inhibir la Hidroxi metil glutaril-CoA –reductasa (HMG-CoA-

reductasa), que es la enzima limitante en la síntesis de colesterol, además de la inhibición en la síntesis de los receptores de LDL, y la activación de la enzima ACAT que esterifica intracelularmente el colesterol libre para su almacenamiento.

Las diferentes demandas de lípidos requeridos por los diferentes tejidos hace que la regulación compleja del metabolismo de ácidos grasos y demás lípidos, características de los mamíferos, se deba a una cantidad de factores de transcripción, como ser los SREBP (de las siglas en inglés de Sterol Regulatory Elements Binding Protein) (Lodish et al., 2005) que controlan la transcripción de proteínas de síntesis y degradación como así de las de transporte y almacenamiento de los mismos, los cuales no serán discutidos en este trabajo, aunque, a fin de graficar estos procesos, se muestra un esquema en la Fig. I-4.

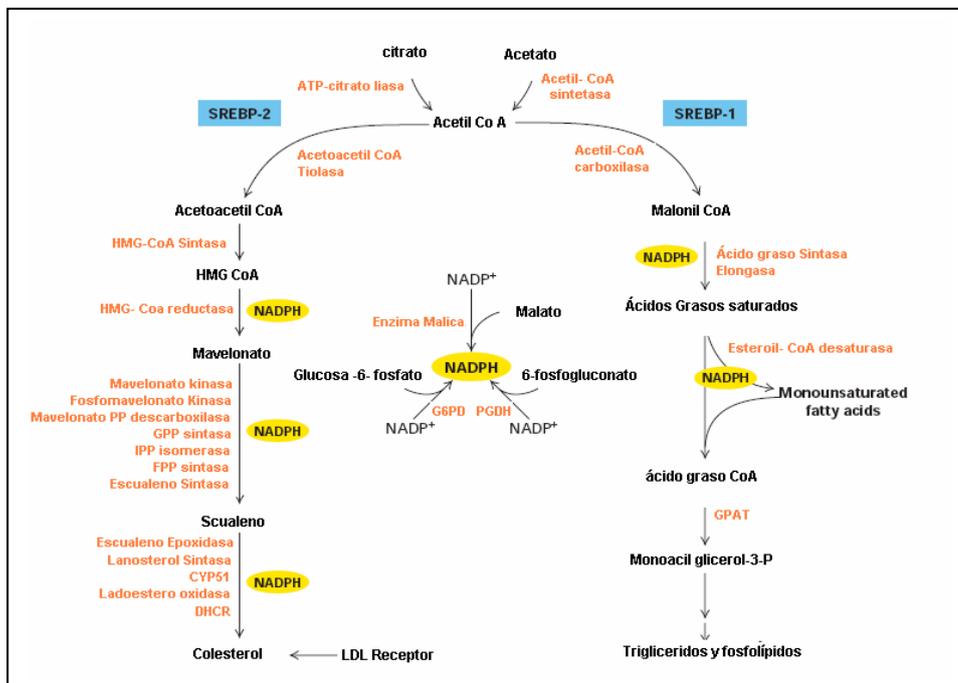


Fig. I-4: se muestra las vías de síntesis de colesterol como de triglicéridos y fosfolípidos, junto con dos factores de regulación (Lodish et al., 2005)

El rol del transporte de lípidos y su implicancia en enfermedades cardiovasculares

Está aceptado y avalado por estudios epidemiológicos la correlación inversa que existe entre los niveles de HDL en plasma y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, en concordancia con el concepto que las HDL protegen contra la aterogénesis (Stampfer et al., 1991). Se demostró que la administración por vía venosa de HDL a ratas con dietas elevada en colesterol (Badimon et al., 1989) inhibe el desarrollo de depósitos lipídicos en la pared aórtica. También se reportó que la administración de HDL después del desarrollo de las lesiones ateroscleróticas indujo a la regresión de las lesiones preexistentes (Yokoyama, 2006). Muchos estudios en modelos animales mostraron también que el descenso de los niveles plasmáticos de HDL, viene acompañado de una lenta remoción de los depósitos lipídicos intra y extracelulares (Small, 1988), pero se observa en algunos casos, que la deficiencia plasmática de los niveles de HDL no está asociada a enfermedades cardiovasculares, lo que implica que una alteración en el transporte de colesterol mediada por las HDL predispone a un individuo a aterogénesis prematura (Assmann et al., 1993).

Esto último puede ser explicado por el hecho que la remoción de lípidos celulares por lipoproteínas protege de lesiones cardiovasculares solamente cuando éstas son ocasionadas y propagadas por otros factores, como ser los que reclutan monocitos en las paredes arteriales e induzcan a la maduración de macrófagos, promoviendo los depósitos de colesterol en éstas y otras células. La acumulación de lipoproteínas ricas en colesterol como las LDL es importante en la formación de las lesiones ateromatosas, ya que estas partículas inducen la liberación de señales inflamatorias reclutando monocitos y son fuente para que el exceso de colesterol sea captado por macrófagos (Williams and Tabas, 1995). Las HDL inhiben la adhesión de macrófagos al endotelio, pudiendo explicar de esta forma porqué pacientes con deficiencia en HDL sufren depósitos masivos de esteroides en macrófagos de varios tejidos, pero no sufren enfermedades cardiovasculares.

Una vez iniciada la lesión aterosclerótica hay factores que influyen en su progresión, entre ellos disponibilidad de las pre β 1-HDL y de la actividad del sistema celular de remover colesterol mediado por apolipoproteínas.

Transporte reverso de colesterol

Las lipoproteínas HDL tienen una gran relevancia en el proceso denominado “Transporte Reverso de Colesterol” (TRC), en el cual el exceso de colesterol es transportado desde las células periféricas (tejido extra hepático) hacia el hígado ó tejidos esteroideogénicos para su catabolismo y eliminación. Este proceso es de gran importancia, ya que el tejido periférico no puede catabolizar el exceso de colesterol. Las HDL participan en varios eventos con implicancia fisiopatológica en la prevención de la aterogénesis (como la inhibición de la adhesión de macrófagos en endotelio ó mediante acción antioxidante (O'Connell and Genest, 2001), pero en particular su participación en el TRC se considera esencial (Lewis and Rader, 2005). El rol de las HDL en el transporte reverso está avalado por datos experimentales y epidemiológicos; entre ellos se observa que las HDL aclaran el contenido de colesterol de determinados cultivos celulares y además que bajo contenido de HDL está asociado a lesiones ateromatosas (Gordon, 1990), como así también que determinados defectos genéticos en el metabolismo de las HDL perturban el transporte reverso del colesterol (Joyce et al., 2003), (Oram and Lawn, 2001).

Hay que tener en cuenta que las HDL no son solamente aquellas que se encuentran en el plasma, ya que las células periféricas se encuentran rodeadas o bañadas de fluido intersticial, separado del plasma por tejido endotelial. Las partículas de HDL llegan a este espacio por filtración desde el plasma a través de este tejido y por excreción de apolipoproteínas desde algunas células periféricas, las que luego son remodeladas a partículas de mayor tamaño.

Las bases moleculares de la biogénesis, de las HDL no están bien entendidas. Las proteínas mayoritarias de las HDL son la apoA-I (un 70% del total de proteínas) y apoA-II, las que son sintetizadas y secretadas por el hígado y células intestinales. Ya sea por interacción de apoA-I libre con membranas celulares, así como por liberación al medio de apo previamente lipidada, se forman partículas con bajo contenido de colesterol. La migración de estas partículas puede ser α ó β dependiendo del tipo celular. La razón de la diferencia no es bien conocida, pero es postulado que las partículas formadas por activación del ABCA1, poseen preferentemente migración α . Se postula que la migración diferencial se debe a la presencia de mayor proporción de lípidos con carga negativa en ese caso, que aumentan su movilidad (Krimbou et al., 2005).

Cuando estas partículas, ó la apoA-I libre de lípidos interaccionan con membranas desencadenan señales intracelulares que favorecen la exportación de colesterol. Entre otras

reduce los pools de colesterol disponibles para el enzima ACAT, y favorece el movimiento de colesterol hacia la membrana, como así también la activación de un miembro de proteínas transportadoras, las “ATP- binding Cassette” (ABCA1). Este transportador posee actividad flipasa (o sea intercambia fosfolípidos desde el lado interno al externo de la membrana), y así, al unir apoA-I (Wang et al., 2001), favorece que la proteína capte fosfolípidos negativos, generando, como se mencionó partículas de movilidad α . (Fig I-5: se muestran dos posibles mecanismo de formación de HDL discoidales)

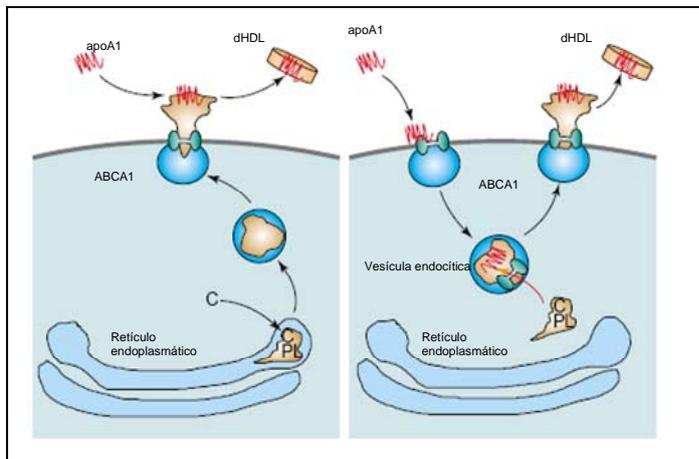


Fig. I-5: Dos posibles mecanismos que muestran como el ABCA1 “carga” a la apoA-I. a): el exceso de colesterol es unido a fosfolípidos en el aparato de Golgi y posteriormente trasladado por ABCA1 y presentado a la apoA-I. b) apo A-I interacciona con ABCA1 y es endocitada, en vesículas intracelular, en donde se unen el exceso de colesterol, posteriormente esta vesícula es vuelta a transportar a la superficie de la membrana

Las apoA-I pobres en lípidos son enriquecidas en colesterol en dominios de las membranas ricos en este lípido, denominados “caveolas”, los cuales no poseen ABCA1.

Una vez enriquecidas de fosfolípidos y colesterol, estas HDLs tienen una conformación discoidal, y pasan del espacio intersticial al plasma en donde son sustrato de la LCAT (Jonas, 2000) que al esterificar colesterol generan un núcleo hidrofóbico de lípidos neutros (en pacientes con déficit enzimático de LCAT existe un aumento de partículas de movilidad pre- β). Por acción continua de esta enzima se va incorporando ésteres de colesterol, formando primero partículas esféricas densas denominadas HDL3, y luego HDL2 (mayoritarias) que incluso se pueden transformar en partículas esféricas más grandes denominándose HDL1. Las HDL2 transfieren ésteres de colesterol a otras lipoproteínas gracias a las proteínas transportadoras de ésteres de colesterol (PTEC), intercambiando triglicéridos desde las LDL o Quilomicrones. La lipasa hepática a su vez hidroliza estos ésteres y convierte las HDL2 en HDL3, siendo buenos aceptores de colesterol celular. La vida media de las HDL es estimada entre 3 y 6 días, pero el intercambio de proteínas y lípidos es de vida media más corta, siendo el proceso general

Distintas conformaciones de las HDL

Se mencionó previamente que las partículas lipoproteicas poseen diferentes conformaciones, inclusive en las mismas especies, que son fundamentales para realizar distintos aspectos fisiológicos. En las HDL estas conformaciones van desde pequeñas partículas discoidales hasta grandes y esféricas, y por lo tanto se requiere que la apoA-I sufra grandes cambios conformacionales a fin de adaptarse a los distintos entornos. De acuerdo al modo de separarlas, ya sea por electrofóresis o gradientes de densidad, existen diversas clasificaciones, (Anderson et al., 1977), (Barrans et al., 1996)

Básicamente existen tres tipos de estructuras de HDL en las que se encuentra la apoA-I: 1) grandes partículas esféricas constituidas tanto por lípidos neutros como por lípidos polares, 2) partículas discoidales constituidas principalmente por lípidos polares y 3) partículas pequeñas pobres en lípidos. Si se realiza una separación electrofóretica bidimensional del plasma humano, la mayor parte de la apoA-I se encuentra asociada a partículas esféricas de movilidad electrofóretica α (9-12 nm de diámetro), y otra pequeña fracción a lipoproteínas de movilidad pre- β (Castro and Fielding, 1988). Tanto en las α como en las pre- β , su densidad y tamaño son heterogéneos.

HDL- esféricas

La mayor proporción de estas HDL contienen apoA-I y apoA-II, siendo esta última la segunda apolipoproteína más abundante en las HDL. La proporción de HDL esféricas que solamente contienen apoA-I (11-45%) se denomina LpAI (Fielding and Fielding, 1981), pudiendo estabilizar un núcleo hidrofóbico de ésteres de colesterol (Scanu and Tardieu, 1971) gracias a la interacción entre los lípidos y las caras hidrofóbicas de las hélices de la apoA-I.

La conformación de esta proteína en estas partículas es muy diferente a la que posee cuando se encuentra formando complejos discoidales, los primeros indicios al respecto fueron realizados con anticuerpos monoclonales que identifican diferentes regiones o epitopes (Marcel et al., 1991), lo que indicaría grandes cambios conformacionales, y por lo tanto gran flexibilidad entre las diferentes regiones de la apoA-I.

Estas partículas esféricas contienen igual masa de lípidos que de proteínas, (en promedio entre las HDL2 y HDL3) y se cree que la apoA-I formaría una monocapa externa rodeando a un núcleo hidrofóbico con la cara hidrofóbica de las hélices anfipáticas

(ver mas abajo) expuesta hacia los lípidos del core hidrofóbico (el esquema se muestra en la figura.I-6). El colesterol libre puede partitionarse entre el núcleo y la superficie, con una mayor fracción en esta última (Lund-Katz et al., 1982), la relación que existe en estas partículas de fosfolípidos/colesterol es de 5/1 (similar a la de las membranas). Todas estas relaciones son dinámicas en el sentido que tanto lípidos como proteínas se pueden intercambiar con otras lipoproteínas en el plasma.

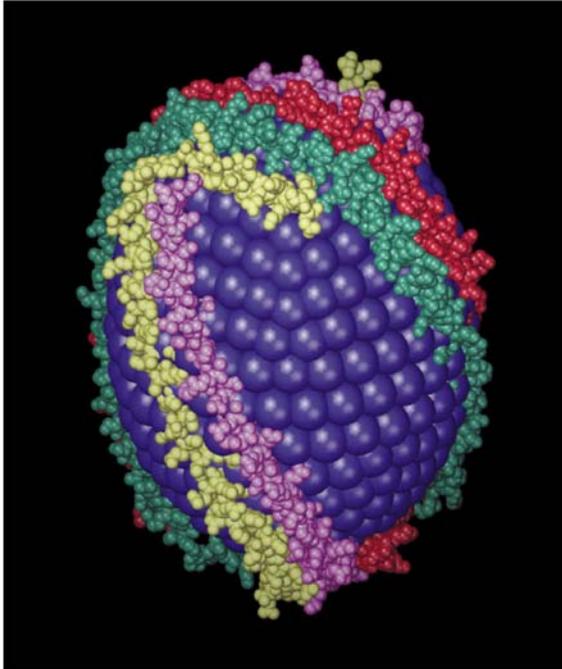


Fig. I-7 Se muestra en la misma el modelo de α -HDL esférica propuesto por Borran (Borhani et al., 1997)

Pre- β -1 HDL (Fielding and Fielding, 1995)

Las pre- β -1 HDL son partículas pequeñas conteniendo solamente apoA-I y pequeña cantidad de fosfolípidos, llamándoselas “lipid Poor”, para diferenciarlas de otras pre- β discoidales más ricas en lípidos, y de las α -HDL; comprenden el 5-8 % de las HDL en plasma, aunque son mas abundantes en linfa y en líquido intersticial. Tienen un peso molecular de aproximadamente 60-70 kD, con un diámetro calculado de 5 a 6 nm. La fracción proteica es solamente apoA-I y la composición lipídica está constituida por lecitina y esfingomielina, en proporciones similares a las encontradas en la membrana plasmática (Cullis and Hope, 1991).

Se ha postulado que la conformación de estas partículas por modelos sintéticos es de pequeños discos o de forma elipsoidal (Luna-Chavez et al., 1994). Con anticuerpos monoclonales se ha encontrado que en las diferentes partículas existen diferentes exposiciones de epitopes, en las pre- β -1 HDL existe un epitope continuo entre los residuos

137 y 144 de la apoA-I nativa, siendo que en presencia de estos anticuerpos las pre- β -1 HDL no pueden remover eficientemente colesterol, en estas partículas se encontró también una susceptibilidad a la proteólisis con trombina cerca del residuo 100 (Kunitake et al., 1990); se predicen en estas regiones giros de tipo β . Otras regiones de la apoA-I generan epitopes de reconocimiento por anticuerpos monoclonales en estas partículas que incluyen el extremo N-terminal y los residuos comprendidos entre 167-174, pero no existen reconocimiento de la región 93-99 como sí ocurre en otro tipo de partículas discoidales (Marcel et al., 1991),(Marcel and Kiss, 2003).

Pre- β -2- HDL Discoidales

Este tipo de partículas discoidales es un pequeña fracción de las HDL's, la proporción que existe es de alrededor de 2-3 % de las HDL plasmáticas, estando en una proporción mayor en liquido intersticial (Barrans et al., 1996). Exponen a anticuerpos monoclonales en la región cercana a los residuos 99-100, diferentes epitopes a los que se presentan en las pre β -1, debido a que al ser de mayor tamaño, la interacción lípido-proteína es diferente. También esta región es mas sensible a proteólisis por trombina (Kunitake et al., 1990). Estas presentan heterogeneidad en tamaño, densidad y composición lipídica, pudiendo contener dos o tres moléculas de apoA-I por disco como único componente proteico. No se sabe cuál es la conformación que posee la apoA-I en estos complejos *in-vivo*, pero se han postulados diferentes modelos, en complejos obtenidos artificialmente (ver más abajo).

Son ricas en lecitina y contienen baja proporción de colesterol y esfingomielina. Las pre β -1 y las pre β -2 difieren básicamente en su contenido lipídico, en especial, lecitina y no se detectan ésteres de colesterol (Barrans et al., 1996).

Aspectos fisiopatológicos en el transporte de colesterol

Una de las mejores evidencias de la relevancia en el transporte de lípidos mediado por apolipoproteínas surge a partir de estudios con fibroblastos de sujetos con una deficiencia genética llamada enfermedad de Tangier, la cual se caracteriza por una ausencia casi completa de HDL en plasma y de apoA-I, y por acumulación de ésteres de colesterol en diferentes tejidos dado por macrófagos tisulares. La estructura de la apoA-I como de sus productos lipoproteicos son normales, y estudios con cultivos celulares de pacientes con esta enfermedad y a la cual se le agrega apoA-I purificada, demostraron una reducida habilidad para remover colesterol y fosfolípidos de dichas células, lo que implica una severa deficiencia en la formación de HDL, y por lo tanto del transporte reverso de colesterol. Esta enfermedad es autosómica recesiva en donde está modificado el gen que codifica para la proteína integral de membrana mencionada mas arriba, el transportador ABCA1. Este tipo de transportador interacciona con la apoA-I o con sus partículas pobres en lípidos, las pre β 1-HDL, en las inmediaciones de la membrana en donde se cargarían de fosfolípidos negativos y/o colesterol. Partículas lipoproteicas con apoA-I de sujetos normales tampoco son capaces de remover lípidos de estas células, sugiriendo que existe un deficiente mecanismo de interacción entre las partículas y el ABCA1. También en esta enfermedad existe una deficiente remoción de colesterol mediado por las otras apolipoproteínas como la apoA-II, E y CIII (Remaley and Hoeg, 1995). El transporte reverso de colesterol puede ocurrir además en parte por mecanismos independientes de ABCA1 como ser una difusión pasiva de colesterol desde la superficie celular a las HDLs, y este mecanismo no estaría afectado en esta patología.

El estudio de esta enfermedad aportó datos sobre el metabolismo de lípidos desde los tejidos a todo el cuerpo y ayudó a la interpretación de bases moleculares del mismo, por ejemplo, el hecho que la apoA-I capte deficientemente colesterol y fosfolípidos lleva a un rápido aclaramiento de apoA-I del plasma y por lo tanto a un déficit de HDL esféricas (Fredrickson, 1964),(Assmann et al., 1993), lo que implica que la remoción de lípidos por apolipoproteínas es un requerimiento absoluto para generar incluso bajos niveles de HDL. La ausencia de HDL a su vez tiene implicancia sobre los niveles de otras lipoproteínas, como ser las LDL, que en estos individuos se encuentra a un nivel de 40% del normal. Los estudios *in vitro* en cultivos celulares demostraron que las apolipoproteínas libres o pobres en lípidos son las precursoras de este proceso, no requiriéndose ninguna en particular, y

solamente pequeñas cantidades de las mismas, son capaces de estimular el proceso, lo que permitiría ser regeneradas continuamente.

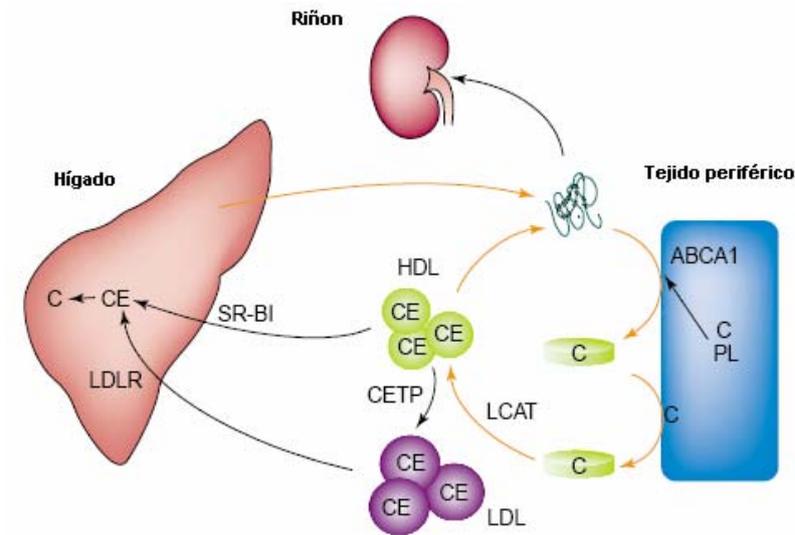


Fig. I-8 a) se muestra en el esquema el transporte reverso de colesterol (Oram, 2002)

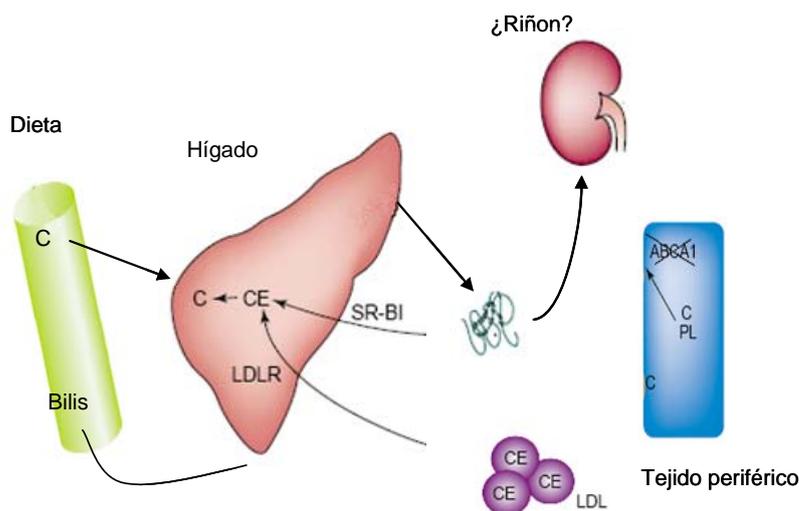


Fig. I-8 b) se muestra el defecto genético que ocurre en la enfermedad de Tangier (Oram, 2002)

Las figuras anteriores (Fig:I-8 a y b) son las que mejor describen el proceso fisiológico y los trastornos metabólicos de la enfermedad de Tangier. Estos pacientes producen niveles adecuados de apoA-I, pero estas moléculas son incapaces de captar fosfolípidos y colesterol de los tejidos periféricos, dado el defecto en el ABCA1. Así las pre β 1-HDL nacientes no pueden dar lugar a las HDL discoidales ni a las HDL maduras, incluso inyectando HDL maduras a estos pacientes, las partículas sufren un rápido aclaramiento, probablemente porque las apolipoproteínas se disocian sin poder regenerar HDL maduras (von Eckardstein et al., 1995). Los bajos niveles de LDL en esta patología pueden reflejar además poco intercambio de ésteres de colesterol provenientes de las HDL, como así también una disminución en la remoción de lípidos desde las membranas hacia el hígado, lo que implicaría un aumento de receptores de LDL y por lo tanto un mayor aclaramiento de las partículas en circulación. Aunque la remoción de colesterol se encuentra disminuida, los niveles del mismo en la membrana no se ven alterados, ya que depende de la síntesis y endocitosis de LDL (Brown and Goldstein, 1986). Como el mecanismo de difusión acuosa no se encuentra alterado puede ayudar a evitar la acumulación de colesterol. Los macrófagos pueden acumular ésteres de colesterol porque pueden internalizar partículas lipoproteicas por fagocitosis via receptores, que no están reprimidos en casos de excesos de colesterol, es por este motivo que a pesar de los bajos niveles de colesterol en plasma de estos pacientes, acumulan exceso de colesterol en los macrófagos (Oram, 2000).

Proteína mayoritaria en las HDL: Apolipoproteína A-I

La apolipoproteína A-I pertenece al grupo de las apolipoproteínas intercambiables por presentar un equilibrio entre sus formas libres y unidas a lípidos. Pertenecen a este grupo las apolipoproteínas A-II, A-IV, C y E, y la apolipoproteína III de insecto. Una característica de las proteínas intercambiables es que están constituidas principalmente por α -hélices anfipáticas. En estas se definen distribuciones de cargas y de polaridad que hacen que exista una cara hidrofóbica y otra hidrofílica.

La forma madura de la apoA-I humana contiene 243 aminoácidos, gran parte de su secuencia posee la capacidad de formar α -hélices (Segrest et al., 1992).

Secuencia de aminoácidos y tipos de α -hélices anfipáticas en la apolipoproteína A-I humana

```

001  ASP GLU PRO PRO GLN SER PRO TRP-ASP-ARG - VAL-LYS-ASP-LEU-ALA-THR-VAL-TYR-VAL-ASP-
021  VAL-LEU-LYS-ASP-SER-GLY-ARG-ASP-TYR-VAL - SER-GLN-PHE GLU GLY SER ALA LEU GLY LYS
041  GLN LEU ASN LEU-LYS-LEU-LEU-ASP-ASN-TRP - ASP-SER-VAL-THR-SER-THR-PHE-SER-LYS-LEU-
061  -ARG-GLU-GLN-LEU-GLY PRO VAL-THR-GLN-GLU - PHE-TRP-ASP-ASN-LEU-GLU-LYS-GLU-THR-GLU-
081  -GLY-LEU-ARG-GLN-GLU-MET-SER LYS-ASP-LEU - GLU-GLU-VAL-LYS-ALA-LYS-VAL-GLN PRO TYR-
101  -LEU-ASP-ASP-PHE-GLN-LYS-LYS-TRP-GLN-GLU - GLU-MET-GLU-LEU-TYR-ARG-GLN-LYS-VAL-GLU
121  PRO LEU-ARG-ALA-GLU-LEU-GLN-GLU-GLY-ALA - ARG-GLN-LYS-LEU-HIS-GLU-LEU-GLN-GLU-LYS-
141  -LEU-SER PRO LEU-GLY-GLU-GLU-MET ARG-ASP - ARG-ALA-ARG-ALA-HIS-VAL-ASP-ALA-LEU-ARG-
161  -THR-HIS-LEU-ALA PRO TYR-SER-ASP-GLU-LEU - ARG-GLN-ARG-LEU-ALA-ALA-ARG-LEU-GLU-ALA-
181  -LEU-LYS-GLU-ASN GLY-GLY ALA-ARG-LEU-ALA - GLU-TYR-HIS-ALA-LYS-ALA-THR-GLU-HIS-LEU-
201  -SER-THR-LEU-SER-GLU-LYS-ALA-LYS PRO ALA - LEU-GLU-ASP-LEU-ARG-GLN-GLY-LEU-LEU PRO
221  VAL-LEU-GLU-SER-PHE-LYS-VAL-SER-PHE-LEU - SER-ALA-LEU-GLU-GLU-TYR-THR-LYS-LYS-LEU-
241  -ASN THR GLN
  
```

Hélice G*

Hélices A

Hélices Y

Fig I-9: En el gráfico se muestra la secuencia aminoacídica de la apo madura (los aminoácidos nombrados según el código de 3 letras).

Por modelado se distinguen tres tipos de hélices anfipáticas en la misma: en el dominio N-Terminal hay una hélice de tipo G* con un arreglo al azar de los residuos polares como en el caso de las proteínas globulares (marcado en verde en la figura I-9). Se predice también la existencia de 6 hélices tipo “A” (marcado en turquesa), típicas de las apolipoproteínas, en las cuales las cargas positivas se agrupan en la interfase lípido/agua y las cargas negativas en el centro de las caras hidrofílicas. Además la apoA-I presenta dos grupos de dos hélices especiales en el centro y en el extremo C, en donde la distribución de

cargas positivas se asemeja a una “Y”, con residuos hidrofílicos positivos en los brazos y con residuos negativos entre los brazos y la base de la “Y”.

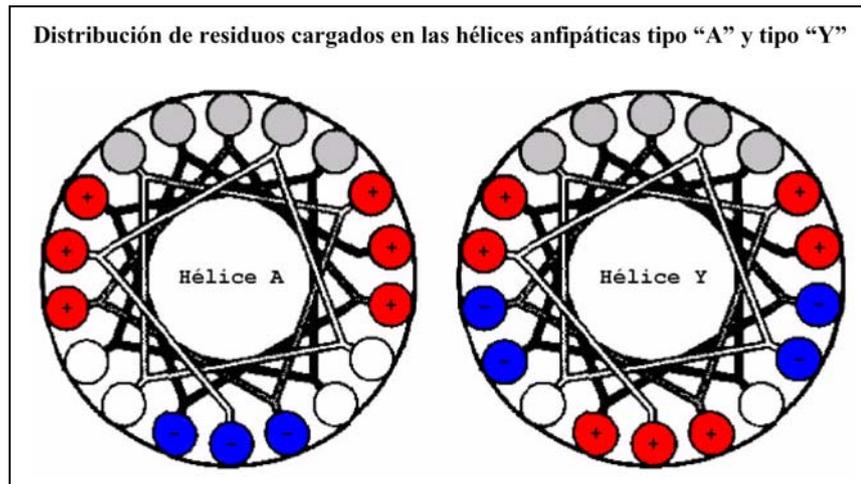
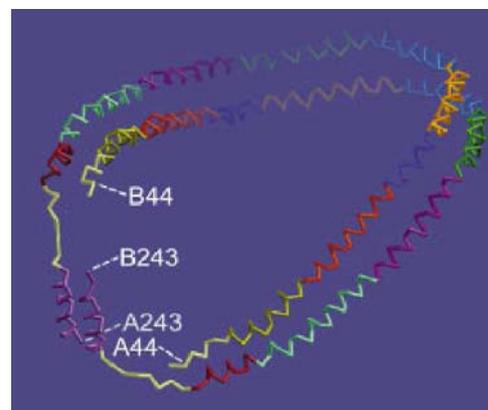
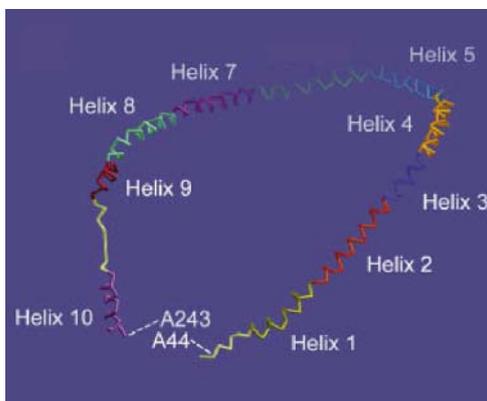


Fig.I-10: En el gráfico se muestra la distribución de cargas en los tipos de α hélices A e Y

Por su gran flexibilidad estructural las apolipoproteínas son muy difíciles de cristalizar, siendo la primera que se logró la apolipoproteína III de insecto; de hecho recientemente se ha logrado cristalizar la forma madura de la apoA-I (Ajees et al., 2006). En el año 1997 se cristalizó una forma truncada de la apoA-I, en donde faltan los primeros 43 aminoácidos ($\Delta 43$ apoA-I) (Borhani et al., 1997), (ver figura I-11); la estructura de la apoA-I truncada, muestra un tetrámero en forma de herradura con un alto contenido de α -hélices extendidas. Esta estructura, aunque confirma la existencia de α -hélices, no concuerda con los datos de apoA-I en solución ni con la estructura cristalina obtenida recientemente, y estaría más de acuerdo a la estructura que adoptaría la proteína en complejos lipídicos discoidales.



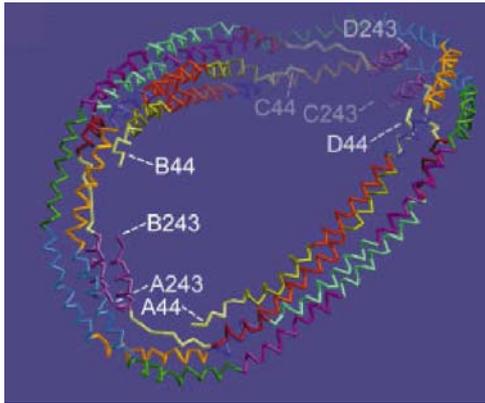


Fig. I-11: Estructura cristalina de la $\Delta 43$ apoA-I, en donde se ven las 10 hélices predichas en la secuencia; en la primera el monómero y como se van agrupando para formar la estructura cristalina, hasta llegar al tetrámero. A, B, C y D representa cada monómero modelado

Como ya se mencionó, la estructura cristalina de la apoA-I ha sido obtenida recientemente con una resolución de 2,4 Å (Ajees et al., 2006), y consiste en dos dominios de hélices, una primera porción de cuatro hélices que corresponden al extremo N- y abarca 2/3 de la secuencia, y otra región de dos hélices que corresponde al resto de la molécula. En total se identifican seis hélices (A-F) a diferencia de las hélices predichas de la secuencia completa y de la estructura cristalina truncada, y lo notable de la misma es que existen amplias regiones de α -hélices con residuos de Prolina, los cuales normalmente se asocian a quiebres o bisagras en las hélices.

El cristal de la apoA-I obtenido recientemente, si bien posee un gran porcentaje en alfa hélices, su estructura difiere de los datos obtenidos por Borhani, y de los obtenidos en solución acuosa por Tricerri y otros. Las hélices N-Terminal son estabilizadas por contacto intra molecular, y están conectadas por giros β . Los que conectan las hélices A-B y las B-C dan movilidad al sistema para que pueda interactuar con membranas. Las dimensiones de la cada proteína son de 88 x 50 x 27 Å, pero si se consideran solamente las cuatro primeras hélices, las dimensiones cambian a 88 x 25 x 27 Å, similar al dominio N-Terminal de apoE (Wilson et al., 1991) (ver Figura I-12).

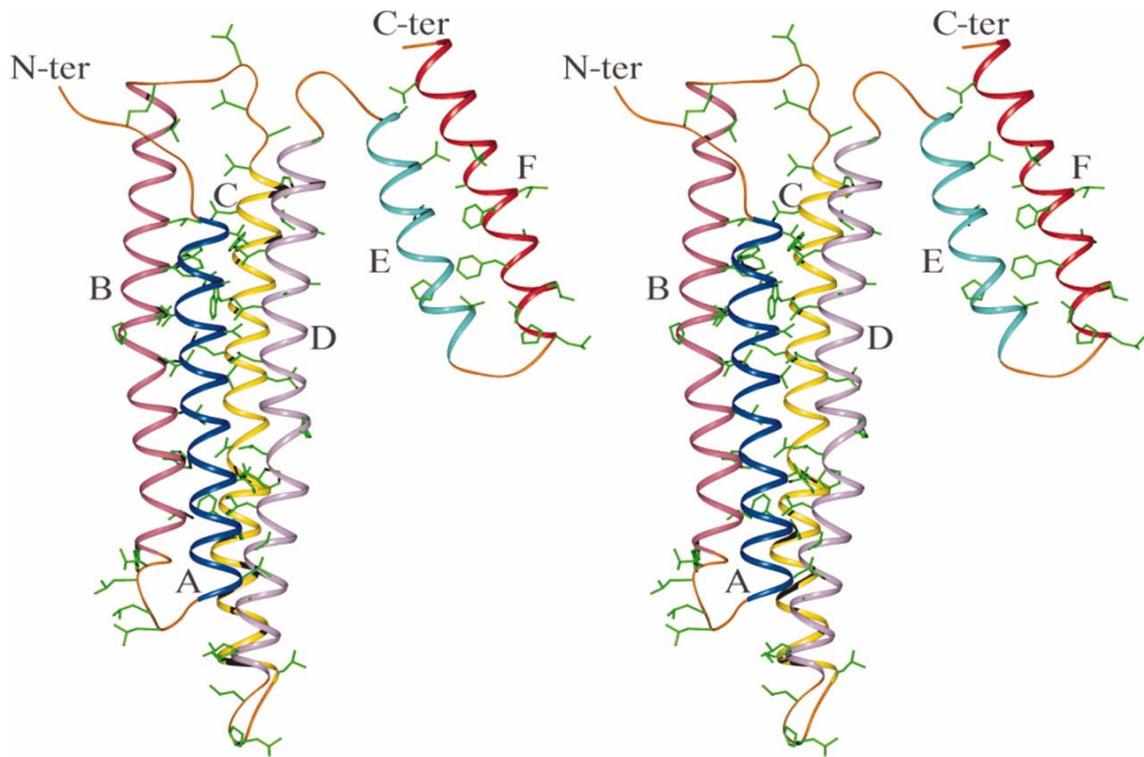
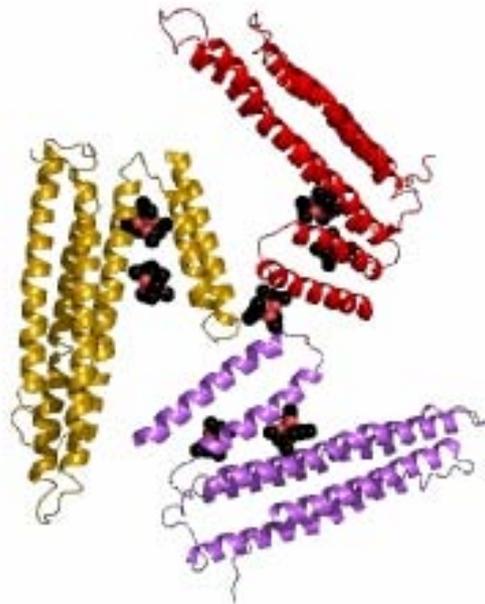


Fig. I-12: Arriba: Estructura cristalina de la apoA-I (Ajees et al., 2006)
 Abajo: Estructura del cristal



En solución apoA-I se considera que posee estructura super secundaria o de “glóbulo fundido” (Gursky and Atkinson, 1996), con un 50-76% de contenido de α -hélice, dependiendo de su asociación con lípidos; a altas concentraciones tiende a agregarse, por lo que se dificulta su cristalización. En cambio la estructura cristalizada predice un 82% de

estructura helicoidal. Esta no es la única diferencia que se encuentra entre la estructura cristalina y otros datos experimentales, ya que además en solución se determinó mediante experimentos con mutantes y transferencia de energía (FRET) (Tricerri et al., 2000), (Behling Agree et al., 2002) (Silva et al., 2005b) y análisis con agentes entrecruzantes que se trata de un toroide cuya relación entre el eje mayor y menor es de 5/1, estando los dominios N- y C- Terminal cercanos entre sí y que sus hélices estarían formando un ramillete; todo esto sugirió que la estructura cristalina encontrada sería una de las conformaciones que la proteína puede tomar en solución, previa a adquirir la estructura final de los discos, similar a la estructura de la proteína con la secuencia truncada.

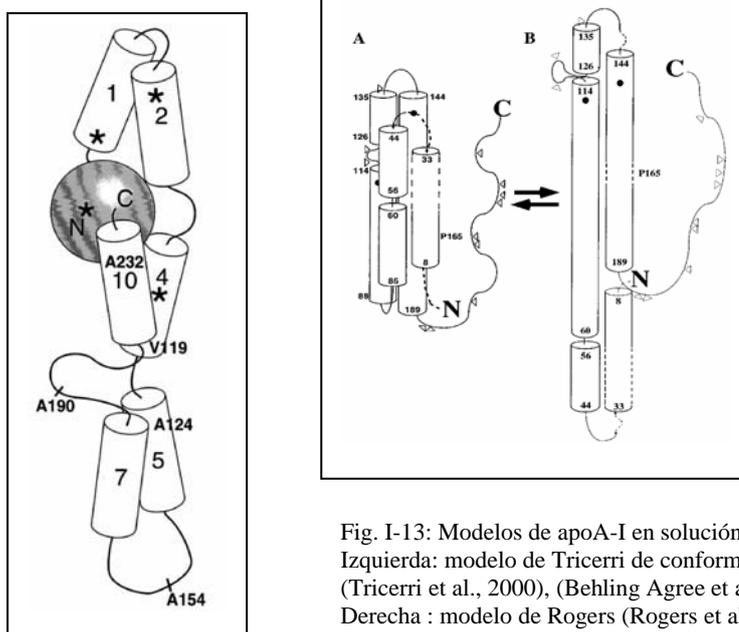


Fig. I-13: Modelos de apoA-I en solución acuosa
 Izquierda: modelo de Tricerri de conformación en solución acuosa (Tricerri et al., 2000), (Behling Agree et al., 2002)
 Derecha : modelo de Rogers (Rogers et al., 1998)

En el análisis global también se identifican en la estructura cristalina regiones hidrofóbicas y regiones de cargas negativas y positivas que tienen implicancias en las interacciones con membranas con ABCA1 y con los SR-B1.

Interacción de apoA-I y de complejos lipoproteicos de apoA-I con membranas lipídicas

La teoría clásica del mosaico fluido de las membranas biológicas, (Singer and Nicolson, 1972) en la cual los lipidos se encuentran organizados en una fase fluida homogénea, ha evolucionado hacia un concepto mas dinámico, indicando un arreglo heterogéneo de los lípidos presentes en una membrana. Por ejemplo, se postula la existencia de dominios típicos en las membranas naturales que son resistentes a la

disolución con detergentes, ricos en glicoesfingolípidos y colesterol. Dichos dominios pueden modificar o regular la interacción lípido-proteínas y por lo tanto mediar en procesos de señalización y difusión.

Es sabido que las interacciones de la apoA-I con membranas dependen tanto del micro ambiente de lípidos, como ser la composición y estado de la membrana (Yokoyama et al., 1980) (Arnulphi et al., 2004), como de la conformación de la proteína (libre de lípidos ó parcialmente lipidada). La proteína libre puede unirse a membranas de fosfolípidos zwiteriónicos en estado líquido cristalino pero solamente a temperatura de transición de fase puede la interacción resultar en una rápida captación o microsolutubilización de fosfolípidos generando complejos discoidales (Ji and Jonas, 1995). Este requerimiento sugiere que debe haber coexistencia de dominios separados lateralmente en donde defectos de empaquetamiento de los lípidos en la membrana facilitan que la apoA-I pueda interaccionar y posteriormente formar los complejos mencionados; el colesterol es capaz de inhibir este proceso, debido a que es capaz de atenuar la transición de fase.

En nuestro laboratorio se demostró, con sistema de lípidos binarios, que esta reacción ocurre cuando coexisten dominios de gel y líquido-cristalino y no ocurre cuando coexisten diferentes dominios en estado fluido o líquido-cristalino y líquido-ordenado. Usando mezclas de dimiristoil y diesteroil- fosfatidil colina (DMPC-DSPC) que presentan coexistencia de fases en un amplio rango, se detectó que la reacción ocurre en el límite inferior del diagrama de fases en donde se observa, mediante visualización de vesículas gigantes por microscopía de fluorescencia de dos fotones, la desaparición de los dominios más fluidos a medida que la apo interacciona (Tricerri et al., 2005). Estos datos sugieren que la reacción requiere pequeños dominios en fase fluida en una fase continua de gel. Del análisis de los productos formados, se confirmó que la remoción de fosfolípidos proviene preferencialmente de los dominios líquido-cristalino.

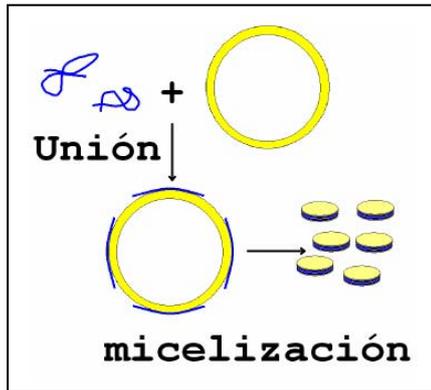


Fig. I-14: Reacción de micelización.
 En la temperatura de transición de fase (gel/líquido-cristalino), se produce la disrupción de la vesícula y la formación de HDL discoidales.
 Esta reacción es desfavorecida por colesterol, pero favorecida por fosfolípidos de carga negativa

La apoA-I o sus complejos lipoproteicos pueden igualmente interaccionar con membranas en estado líquido cristalino sin que ocurra un proceso de micelización, siendo este proceso de gran importancia en el intercambio de colesterol entre las HDL y las membranas. La presencia de colesterol en las membranas favorece la unión de la apoA-I (Yokoyama et al., 1980), y ya en 1992 se había postulado que un segmento flexible de apoA-I (Rothblat et al., 1992) quedaría disponible en los complejos discoidales para interaccionar con membranas y favorecer el intercambio de colesterol. Este segmento no quedaría disponible en las α -HDL ya que estaría en estrecho contacto con los lípidos de la esfera y no puede interactuar con membranas. Así el cambio conformacional que sufre apoA-I en pasar de estado libre de lípidos, luego a complejos discoidales y por último a partículas esféricas determinaría una disminución de la afinidad por membranas y la liberación a circulación de α -HDL. El inconveniente de esta hipótesis es que se requeriría la presencia de LCAT para la conversión de discos en HDL esféricas (Rothblat et al., 1992), y esta enzima no existe en el líquido intersticial.

Una de las formas de caracterizar interacción con membranas es midiendo la pérdida de compuestos hidrosolubles que se encuentran en el espacio acuoso de vesículas lipídicas. Tanto apoA-I libre como complejos lipoproteicos discoidales inducen una pérdida transitoria del contenido acuoso, atribuido a una desestabilización temporaria de la membrana debido a la inserción de algún dominio de la apoA-I (Tricerri et al., 1998). La apoA-I libre y complejos discoidales más pequeños y sin colesterol fueron los más eficientes para el proceso, además la presencia de colesterol en las membranas aumentó la pérdida de agua (Tricerri et al., 1998). En otros estudios se demostró que los discos de menor tamaño son los que tienen mayor afinidad por las vesículas (Tricerri et al., 2002), y favorecen también el intercambio de colesterol, estando correlacionado por una mayor

afinidad a membranas, lo que hace sugerir que una porción de apoA-I favorece el anclaje y posterior intercambio de colesterol entre ellas y las partículas.

Estos hechos y el que no existe LCAT en el líquido intersticial dieron razón para modificar la hipótesis original de Rothblat (Rothblat et al., 1992) en el sentido en que el aumento de tamaño y contenido de colesterol de los discos, en lugar del cambio morfológico de discos a esfera, sería el ó los factores que producirían un cambio conformacional de la apoA-I que disminuye su afinidad por membranas, liberando al plasma grandes discos de HDL enriquecidos con colesterol. Este mecanismo no requiere la presencia de LCAT en el espacio intersticial y tendría importancia fisiológica, ya que las pequeñas partículas de apoA-I pobremente lipidadas por ABCA1 podrían entonces unirse a las caveolas y cargarse de lípidos y colesterol para luego liberarse a circulación para ser un buen sustrato de LCAT.

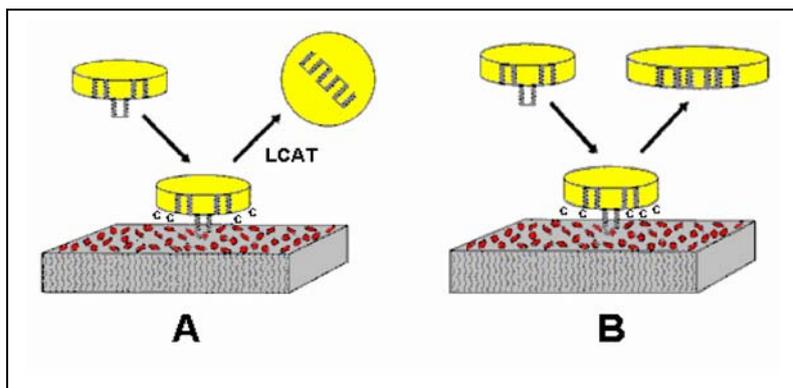


Fig. I-15: A) Hipótesis de Rothblat et al. (Rothblat et al., 1992) B) Hipótesis modificada en base a nuestros resultados (Tricerri, 1998, Tesis Doctoral; (Fielding and Fielding, 2001); (Tricerri et al., 1998); (Toledo et al., 2000)

Conformación de la apoA-I en complejos discoidales

Las HDL discoidales y las pre- β de pequeño tamaño, son las primeras partículas que se liberan por el hígado y células intestinales, y consisten en una bicapa fosfolipídica que no puede existir si no son estabilizadas sus regiones hidrofóbicas por proteínas, y la apoA-I entre otras apolipoproteínas, puede realizar esta tarea. Su espesor es similar al de las membranas, aproximadamente 54 Å, pero su diámetro depende de la relación entre lípidos y proteínas.

A fin de estudiar el metabolismo de las HDL plasmáticas se desarrollaron y caracterizaron partículas artificiales que sirvan de modelo a las distintas HDL. Uno de los métodos fue explicado más arriba, en donde la apoA-I “aprovecha” los defectos de estructura a temperatura de transición de fases de los fosfolípidos. El inconveniente de esta técnica es que está acotada a unos pocos fosfolípidos, cuya temperatura de transición está en un rango conveniente de trabajo, como ser DMPC. Otra técnica ó metodología para obtener estos discos es por diálisis, en donde se agrega a una mezcla de lípido requerida, una cantidad determinada de un detergente dializable, como ser el colato de sodio (ver materiales y métodos), en un primer momento el colato estabiliza las cadena hidrofóbicas favoreciendo la formación de complejos con estructura plana tipo bicapa, y luego el agregado de apoA-I, desplaza al detergente, ayudado por el gradiente químico que se forma en el proceso de diálisis (Jonas et al., 1989).

Se pueden formar discos de diferentes tamaños pudiendo variar en la cantidad de apoA-I (dos o tres moléculas por partícula) o en la cantidad de lípidos, pudiendo haber partículas con la misma cantidad de proteína y distinta cantidad de fosfolípidos, denominándose R_n-m, en donde “n” significa la cantidad de proteína que constituye el disco y “m” da idea de la cantidad de fosfolípidos que posee o del radio de Stokes. Cuanto mayor es la cantidad de fosfolípidos, mayor es el diámetro y mayor es el número “m”.

Las partículas más caracterizadas son las que poseen dos moléculas de apoA-I, principalmente por ser las precursoras de las HDL esféricas, y los diámetros son 77 Å (R2-1), 88 Å (R2-2), 98 Å (R2-3), 106 Å (R2-4) y 110 Å (R2-5), (Li et al., 2004) requiriéndose una estequiometría mínima para la formación de las partículas. En las partículas con el mismo número de moléculas de apo, el cambio de diámetro no es continuo, sino en forma discreta a lo largo de una o dos hélices, lo que sugirió, junto con los resultados de anticuerpos monoclonales, la presencia de regiones “bisagra” de alta flexibilidad, que al estar en conformaciones alternativas, ya sea abiertas o cerradas, permitiría que diferente

número de hélices estén expuestas al medio acuoso ó en contacto con los lípidos del borde de los discos, respectivamente.

Los discos que poseen dos apoA-I por moléculas, están bien caracterizados (Jonas et al., 1990); (Gursky and Atkinson, 1996) dos tipo de diámetros de Stokes de 78 y 96 Å, con alrededor de 30 y 70 moles de fosfolípidos por mol de apoA-I, respectivamente. La conformación de la apoA-I en estas partículas es diferente (Bergeron et al., 1995) y (McGuire et al., 1996) teniendo implicancia fisiológica, las de menor diámetro son unas 60 veces mas afines a los receptores de SR-BI (Jonas et al., 1989) y poseen ~ 16 veces menor capacidad de activar a LCAT. (de Beer et al., 2001a); (de Beer et al., 2001b). La forma truncada de la proteína no puede formar los discos de mayor tamaño de la serie mencionada (Li et al., 2004), y sí lo puede hacer cuando se agrega la región faltante al armar estas partículas por diálisis.

Cualquier modelo propuesto para la conformación de la proteína en los discos se debe basar en la existencia de hélices anfipáticas y los motivos de mayor asociación a lípidos, en la geometría planar de los discos, la diferencia de polaridad entre los lípidos y el solvente, como así también en los posibles puentes de hidrógeno o salinos inter e intramoleculares.

Uno de los primeros modelos que explicaba la conformación de los discos proponía (Phillips et al., 1997) que las hélices de dos apoA-I se orientaban en los discos en forma paralela a las cadenas hidrocarbonadas, y rodeando en forma de “empalizada” aproximadamente 160 moléculas de fosfolípidos, en este modelo las repeticiones helicoidales de apoA-I constituidas por 22 residuos abarcaban prácticamente la totalidad del espesor de la membrana, además de explicar la presencia de prolinas en la unión a lípidos a intervalos regulares (Ver fig. I-16).

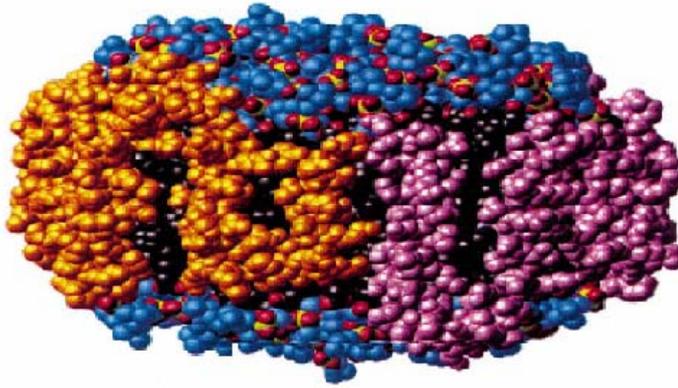


Fig I-16: .Modelo del cerco
(Phillips et al., 1997)

Este modelo fue muy aceptado durante aproximadamente 20 años, pero se empezó a cuestionar con la obtención de la estructura cristalina de la apo truncada (Borhani et al., 1997), Luego, trabajando con mutantes simples de triptofano en las posiciones 108 y 115 en la mitad de la secuencia de la proteína, pertenecientes a la hélice “4” pero a diferentes alturas (Maiorano and Davidson, 2000), observaron que la fluorescencia intrínseca de ambos residuos en los discos era quencheada o apagada en similar extensión por agentes ubicados en la región central de la bicapa, sugiriendo que por lo menos esta región debería estar ubicada en forma perpendicular a la cadena hidrocarbonada. El modelo de empalizada tampoco podía explicar otros datos experimentales como los de Li y Tricerri (Li et al., 2000),(Tricerri et al., 2001) realizados con técnicas espectroscópicas de FRET y usando mutantes puntuales marcados específicamente en distintas posiciones, los cuales indicaban que el eje de las hélices se disponían paralelo a la superficie de la partícula.

Se mencionó anteriormente que la estructura cristalina de una forma truncada de apoA-I fue cristalizada antes que la estructura entera, y esta presentaba una estructura circular, muy parecida en las dimensiones a las de los discos. El estudio con agentes entrecruzantes y proteólisis parcial y posterior estudio de estos fragmentos hizo proponer a los investigadores Li , Davidson y Segrest (Segrest et al., 1999) que dos apoA-I se ubicarían en estas partículas en forma de cinturón (“Belt Model”), ya sea en forma de dos cadenas paralelas (ver figura I-14) o en forma de “Z”, estando las hélices 5 y 6 de diferentes moléculas muy próximas e interactuando entre si. (Silva et al., 2005b).

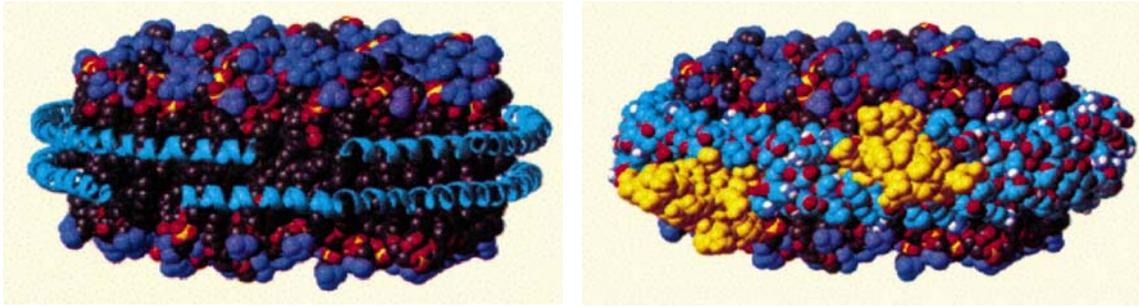


Fig I-17: Modelos del cinturón (Segrest et al., 1999)

Otros modelos son propuestos para la ubicación de la apoA-I, en donde ésta se plegaría en aproximadamente la mitad de la proteína involucrando a diferencia de los otros modelos a las hélices “3” y “4” y adquiriendo una forma de hebilla, y dos de estas hebillas rodearían el borde del disco (Tricerri et al., 2001) planteándose una interacción de tipo cabeza-cabeza o cabeza-cola (figura I-18).

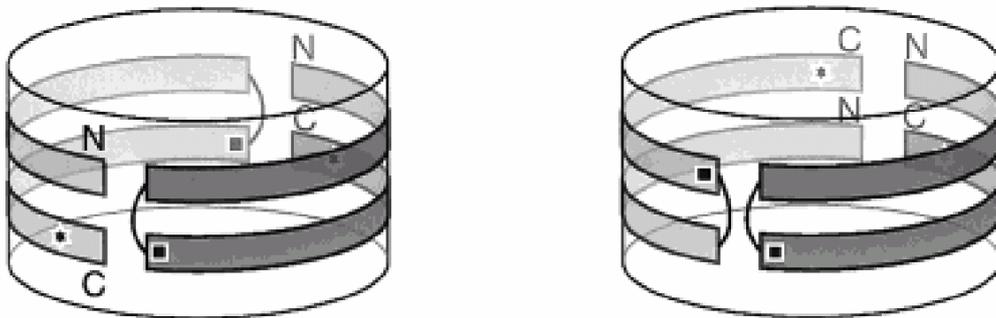


Fig. I-18 Modelos de Tricerri et al (Tricerri et al., 2001)

Luego, Silva y colaboradores (Silva et al., 2005a), analizaron las regiones helicoidales que interaccionan entre si en los discos. Mediante el uso de reactivos entrecruzantes de Lisina y con posterior proteólisis, obtuvieron evidencias que soportan el modelo de cinturón aunque también detectan la coexistencia de dos configuraciones que varían en el registro de la hélices: en una de ellas (configuración 5/5) quedarían enfrentadas entre si las hélices 5 de cada apo A-I, mientras que en la segunda (configuración 2/5) le hélice 2 de una molécula de apoA-I queda enfrentada a la hélice 5 de la otra molécula.

Básicamente estos son los modelos que existen en la actualidad que explican cuál es la conformación de la apoA-I en los discos, pero por más que las distintas técnicas avalan uno ú otro, no se sabe con certeza cuál de ellas son los que realmente se liberan *in-vivo*, ya que los experimentos *in vitro* no pueden descartar ninguna de las posibilidades de modelos propuestos.

La región central de la apoA-I

El hecho que tanto la apoA-I como partículas discoidales (las de menor tamaño y libres de colesterol) son capaces de inducir pérdida parcial de contenido en vesículas, hizo sugerir en nuestro grupo que existe una región de la proteína que es la encargada del anclaje en membranas y se insertaría profundamente en las mismas. La detección de dicho fragmento se logró utilizando un reactivo fotoactivable marcado radiactivamente con $^{125}\text{I}_2$ (Corsico et al., 2001). Estos grupos fotoactivables particionan en fase lipídica y consiste en un grupo Diazirina que por fotólisis se reordena a carbeno, especie capaz de reaccionar con cualquier sustancia que posea un enlace químico, así las regiones en contacto con lípidos o inserta en ellos serán radiomarcadas cuando se iluminan en presencia de estos reactivos (figura I-19).

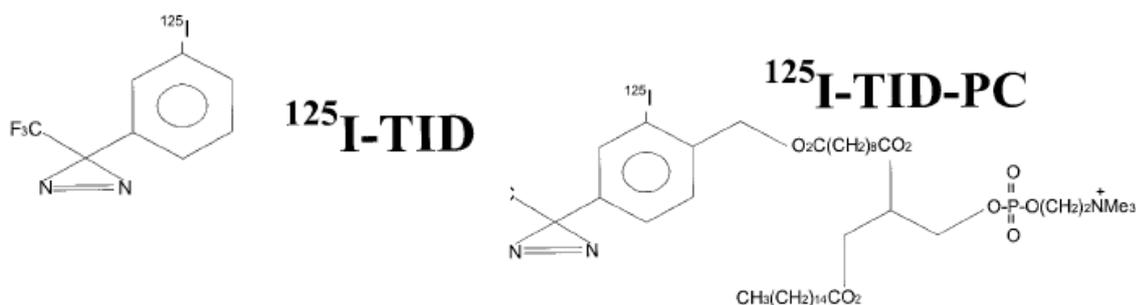


Fig. I-19: Reactivos fotoactivables

Luego de fotolizar la muestra en contacto con este reactivo se deslipidizó, y clivó químicamente con bromuro de cianógeno (CNBr, o hidroxilamina), luego los fragmentos peptídicos obtenidos fueron separados por electroforesis de poliacrilamida, y posterior análisis de su secuencia N-Terminal, y la distribución de radioactividad analizada por auto radiografía. El reactivo ^{125}I -TID fue utilizado para determinar qué región de la apoA-I tenía menor contacto con los lípidos del disco, encontrándose que, de los diferentes fragmentos que rinde la proteólisis con CNBr (1-86, 87-112, 113-184, 185-243), los péptidos 87-112 y 185-243 (pertenecientes a la región central y al C-Terminal) son los que poseen menor contacto con los lípidos de los discos.

Al utilizar ^{125}I -TID-PC/16 en vesículas, el cual tiene poco intercambio, para determinar cuál es la región de apoA-I que se inserta en membranas, se encontró que solamente el fragmento 87-112 aparece radio marcado cuando se enfrentan las vesículas a la proteína libre de lípidos o a complejos discoidales. Estos resultados permitieron concluir que existen dos regiones que no están en contacto con lípidos de los discos y que además la región central que involucraría las dos hélices "Y" centrales 3 y 4, serían las que interaccionan con los lípidos de las membranas.

El análisis de la región de las hélices "Y" centrales de apoA-I con el programa PSSM reportó que la misma posee un alto grado de analogía estructural con una toxina peptídica (Kelley et al., 2000) de 7.9 kD llamada ectatomin, cuya estructura en solución fue resuelta por RMN (Nolde et al., 1995). Ésta toxina consiste de dos cadena homólogas de 34 y 37 residuos de conformación similar. Cada una consiste de dos hélices y una región bisagra de cuatro residuos, dando una estructura total de un ramillete de cuatro hélices. Al insertarse en membranas dos moléculas de ectatomin forman un canal iónico gracias a una considerable reorganización de su estructura.

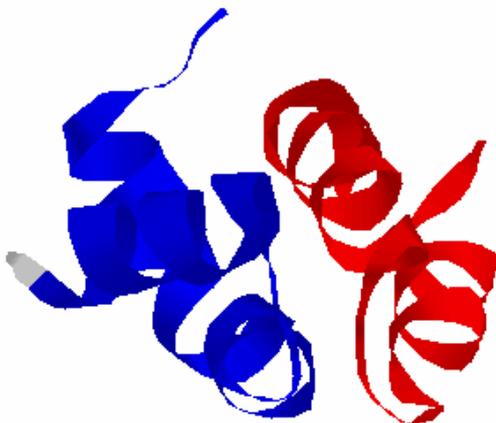


Fig. I-20: Ectatomin, una toxina peptídica de 7,9 kD cuya estructura es conocida por NMR (Nolde et al., 1995). y que se inserta en membranas para formar un canal iónico (Pluzhnikov et al., 1999)