

CAPÍTULO V:
DISCUSIÓN

1. Obtención y caracterización de las mutantes

Para resolver cualquier ensayo experimental es fundamental contar con un sistema de proteínas que sirvan para resolver preguntas concretas. En nuestro caso, como la apoA-I posee 4 residuos de Triptofano (Trp), cualquier medida utilizando las propiedades intrínsecas de este, como ser fluorescencia, daría como resultado un promedio de las características de emisión de todos los residuos. Por tal motivo, para estudiar el entorno de la región central se planificó la construcción de mutantes simples conteniendo un solo residuo Trp en distintas posiciones a lo largo de su secuencia.

La obtención de mutantes de proteínas provenientes de células eucarióticas, y su expresión en bacterias, no es simple. Por empezar, la abundancia de los ARNt que reconocen codones sinónimos difiere entre eucariotes y procariotes, lo que puede traer aparejado una disminución en la eficiencia de expresión. Además, la expresión de proteínas foráneas puede traer aparejado una toxicidad que no es posible predecir en el momento de diseñar o planear dichas mutaciones. (Yadava and Ockenhouse, 2003). Entre otras, estas razones pueden explicar el porqué en algunos casos no se logró la expresión del cDNA mutado.

Asimismo, cuando se obtienen proteínas mutantes en sistema bacterianos, su extracción de las células en muchos casos debe hacerse en condiciones desnaturizantes, como fue en nuestro caso, debido que la sobreexpresión de las mismas induce su depósito en los cuerpos de inclusión bacterianos. Este paso en muchos sistemas es limitante, principalmente si la proteína es inestable ó sensible a determinadas condiciones. Por suerte, nuestro sistema de expresión es bastante “noble” y se ha logrado obtener apreciable cantidad y buen grado de pureza de las mutantes que expresaron, y en condiciones aptas para realizar los diferentes ensayos proyectados.

Para que estas mutantes de único Trp nos informen sobre la conformación de la proteína nativa, es esencial que las mutaciones no introduzcan grandes cambios (estructurales o funcionales) respecto a la proteína nativa. Por esto, una vez obtenidas las proteínas recombinantes, y luego del corte con la enzima proteolítica igasa y de la confirmación de su pureza y peso molecular mediante SDS-PAGE (como era esperable, todos los mutantes analizados presentaron peso molecular 28 kD, correspondiente a la apo madura de 243 aminoácidos), fue fundamental realizar el análisis de la estructura secundaria por dicroísmo circular. Los espectros adquiridos en el UV lejano (entre 195 y 250 nm) fueron característicos de proteínas con un alto contenido de α -hélices, siendo

lo máximos y mínimos característicos de la apoA-I (Cho and Jonas, 2000). Esto confirma que las mutantes W@93, W@104 y W@108, mantienen su estructura secundaria sin alteraciones significativas respecto a la proteína nativa.

Una técnica extensamente utilizada para la caracterización funcional de apoA-I es, como fue mencionada, la medición de la cinética de micelización de partículas multilamelares de DMPC a temperatura de transición de fase. En este caso, las mutantes mostraron una cinética más lenta que la apo Wt (analizado por disminución de turbiedad a 350nm) pero la densidad óptica es la misma al cabo de 8hs a 24⁰C, dando partículas discoidales del mismo peso molecular luego de los ciclos de temperaturas a las que fueron expuestos. Como todas las mutantes testeadas (incluida W@108 que en su región central conserva la secuencia original) presentan una cinética de micelización más lenta que apoA-I Wt, esto no se debería a las mutaciones introducidas en la región central sino a aquellas introducidas para eliminar los otros tres Trp. Mutantes similares obtenidos por el Dr W.S. Davidson, presentaron una variación de energía libre de plegamiento ligeramente disminuida cada vez que un Trp fue reemplazado por una Phe (Davidson et al., 1999)

Del análisis de estos datos concluimos que si bien las mutantes reaccionan más lentamente con vesículas de DMPC, la estructura proteica se mantiene inalterada en los complejos lipoproteicos resultantes; y por lo tanto estas mutantes pueden ser utilizadas como modelo en los estudios conformacionales de apoA-I en los estados libre y unida a lípidos.

Una vez obtenidos los mutantes, nos planteamos el objetivo de caracterizar la participación del dominio central en procesos de adaptación estructural (conformación en los distintos estados), e independencia funcional en la remoción de lípidos. Los datos presentados en este estudio confirman el cambio conformacional que experimenta la apoA-I para adaptarse al microambiente lipídico, y aportan información sobre la participación de la región central de la proteína en las distintas conformaciones: en el estado libre de lípidos, en la interacción con membranas, y en complejos lipoproteicos.

2. Conformación de la región central en la proteína libre de lípidos (lipid-free)

Como se mencionó en la Introducción, la estructura de apoA-I libre fue estudiada por distintas técnicas, pero dada la alta discrepancia que existe entre las estructuras cristalinas, así como entre éstas y los datos de la proteína en solución, es importante profundizar en su caracterización. En particular de la región central que nos interesa.

Si bien en estado fisiológico prácticamente no se detecta apoA-I libre de lípidos, dado que rápidamente se combina con fosfolípidos para formar diferentes tipos de HDL nacientes (Krimbou et al., 2005), *in vitro* en solución acuosa la apo se encuentra en forma de toroide en donde los dominios N y C-terminal están muy próximos (Tricerri et al., 2000), (Behling Agree et al., 2002) y en equilibrio entre monómeros y dímeros en concentraciones de 0.1 mg/ml, u oligómeros de mayor peso molecular dependiendo de la concentración proteica (Cho and Jonas, 2000)

Los espectros de emisión de fluorescencia en solución acuosa de los mutantes que contienen un solo Triptofano en la región central, indican que los residuos en las posiciones 93 y 108 se encuentran en un ambiente hidrofóbico, mientras que el 104 se encontraría en un ambiente más polar. Como era de esperar, la fluorescencia de las tres mutantes se corre a mayores longitudes de onda por la denaturalización con guanidina-HCl 3M. Sorprendentemente, sin embargo, para W@93 y W@104 esto va acompañado de un aumento en la intensidad de emisión. Ya que además del desplegamiento, la denaturalización también implica seguramente una disrupción de los dímeros u oligómeros, esto nos indujo a pensar que el rendimiento cuántico de los Trp de estas mutantes podría estar disminuído por homotransferencia de energía Trp-Trp. Este hecho fue confirmado al medir la intensidad y anisotropía de la fluorescencia de los distintos mutantes en función de la concentración de la proteína (Moens et al., 2004). Se encontró que las tres mutantes, pero especialmente W@93 y W@104, sufren un aumento en la intensidad y anisotropía de fluorescencia a medida que la muestra se diluye, asociándose estos cambios al desplazamiento del equilibrio hacia la forma monomérica al disminuir la concentración proteica. Así, esto indica la existencia de homotransferencia de energía Trp-Trp en los dímeros (u oligómeros) de estas mutantes. Ya que este fenómeno sólo puede ocurrir si la distancia entre los Trp es cercana o inferior a 1 nm, estos resultados indican que el par de hélices 3-4 de apoA-I está comprometido en el proceso de oligomerización, de manera que el par de hélices de una

molécula de apoA-I interactúa y queda en estrecho contacto con el par de hélices equivalente de la otra molécula en el dímero. Una probable conformación dimérica es esquematizada en la figura V-1, modelada con el programa Movie-Maker (accesible desde la página www.expasy.org), de acuerdo a la estructura cristalina predicha para la apo completa , código de acceso PDB 2AV1, (Ajees et al., 2006)

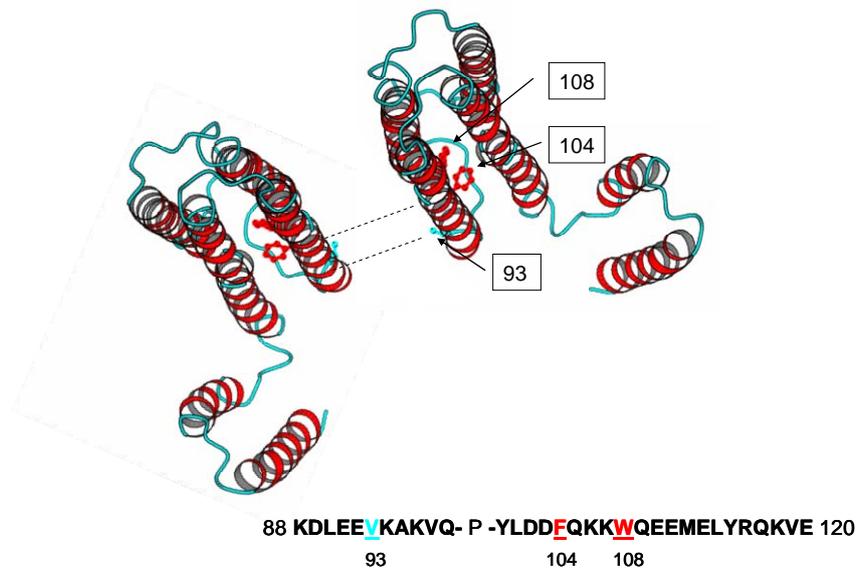


Fig.V-1: Modelado según Movie Maker (www.expasy.org), usando el código de acceso del PDB 2A01 (Ajees et al, 2006)

La participación del par de hélices Y central en la oligomerización es además soportada por el hecho de que el péptido AI 77-120 también es capaz de dimerizar en solución acuosa. La tendencia a dimerizar de AI 77-120 es sin embargo bastante menor que la de apo A-I, lo que sugiere que otras hélices también podrían participar en el proceso. La relativamente alta estabilidad de AI 77-120 en la forma monomérica podría ser explicada por el menor ancho de las caras hidrofóbicas en relación a las hidrofílicas que presentan las hélices 3 y 4. Esto permitiría la exclusión de casi la totalidad de los grupos no polares del medio acuoso simplemente por la interacción entre las caras hidrofóbicas de estas hélices como se indica en la figura V-2.

Para la forma dimérica (u oligomérica), se pudo obtener una estimación de las distancias entre los residuos Trp de las 3 mutantes mediante la extrapolación de los datos de intensidad y anisotropía a dilución y concentración infinita (ver sección 2a de resultados). Estas distancias son del orden del ancho del esqueleto de una α -hélice: 3,5-5 Å para W@93 y W@104, y algo mayor (5-6,5 Å) para W@108, lo que indica que los pares de hélices 3-4 de cada molécula de apo A-I en el dímero interactúan entre sí por sus caras hidrofóbicas. Un modelo probable que compatibiliza estas distancias es mostrado en la figura V-3a. En el mismo puede observarse que el residuo 104 queda localizado en la interfase entre ambas caras (hidrofílica e hidrofóbica) de la hélice, lo que podría ser la causa del entorno relativamente más polar encontrado para el Trp de W@104 en comparación con las otras mutantes.

3. Interacción de la apoA-I en estado libre de lípidos con membranas

Dado que la región central de la apo es candidata a jugar un rol importante en la interacción con membranas, se estudió en este trabajo la participación de este dominio en la interacción con vesículas lipídicas, en situación donde no hay formación espontánea de productos lipoproteicos en un tiempo corto.

a) Análisis estructural:

Los resultados sugieren que la estabilización de la conformación dimérica propuesta para la proteína en solución es favorable a la interacción con membranas. Un rearrreglo estructural sería necesario respecto a la estructura de la proteína en solución, como lo indica el hecho de que, si bien el entorno de los residuos 104 y 108 no se modifica drásticamente, el residuo 93 se localiza en un entorno más polar cuando la

proteína está unida a la membrana. Sin embargo, como indican los datos de dicróismo circular con el péptido AI 77-120, el proceso de inserción en la membrana no implicaría cambios significativos en la estructura secundaria (aumento de alfa hélice), sino que es favorecido por la adquisición de estructura cuaternaria como se demostró en los ensayos de crosslinking tanto con apoA-I como con AI 77-120. Esto nos permitió postular que el dominio de inserción activo sería un ramillete de hélices intermolecular, formado por los dos pares de hélices Y centrales de la proteína dimérica.

Por otro lado, las mediciones de extinción de la fluorescencia de W@93, W@104 y W@108 con quenchers paramagnéticos localizados a diferente profundidad en la bicapa lipídica de vesículas, nos permitió estimar la profundidad en la que se localizan cada una de las posiciones reportadas por los Trp, y así deducir la topología de inserción del par de hélices 3-4 en la membrana. Por la aplicación del método del "Parallax", se estima una distancia del centro de la bicapa de aproximadamente 13, 10 y 16 Å para los residuos de las posiciones 93, 104 y 108, respectivamente. Estas distancias del centro de la bicapa pueden ser compatibilizadas en el esquema mostrado en la figura V-4a. Considerando que el avance de una α -hélice es de 1,5 Å por residuo, la diferencia de 6 Å entre la profundidad de localización de las posiciones 104 y 108 indican que la hélice 4 se inserta verticalmente o con su eje mayor bien perpendicular a la superficie de la membrana. En el caso de la hélice 3, si bien sólo tenemos el dato de la posición del residuo 93, su localización a una profundidad intermedia entre la de los residuos 104 y 108 indican la presencia de un giro (que muy probablemente ocurra en Pro 99) y una disposición antiparalela a la hélice 4.

Dado que como ya mencionamos, las caras hidrofóbicas de las hélices anfipáticas 3 y 4 poseen una superficie relativamente menor que las caras hidrofílicas, la inserción vertical de un único par de hélices interactuando por sus caras hidrofílicas (como mostrado en fig V-4a) es muy improbable debido a que no podría excluir completamente a los grupos polares de su exposición al entorno hidrofóbico de la membrana. Esta exclusión sí podría lograrse mediante la inserción de un ramillete intermolecular de estas hélices interactuando entre sí por las caras hidrofílicas como se muestra en las figuras V-3b y V- 4b. La ausencia de monómeros de apoA-I o AI 77-120 en el estado unido a membrana es un argumento a favor de esta hipótesis. Esta organización de hélices anfipáticas es encontrada en muchos canales iónicos y transportadores de sustancias polares como los GLUT, aunque en estos casos las hélices atraviesan completamente la membrana. También esta disposición de las hélices fue

propuesta para el estado insertado en membranas de ectatomin, péptido para el que como se mencionó se predice analogía estructural con la región central de apoA-I. En el caso de apoA-I, no se formaría un canal hidrofílico completo ya que las hélices no atraviesan completamente la membrana. Sin embargo, este "hemicanal" podría explicar el incremento transitorio de permeabilidad al contenido acuoso de vesículas fosfolípídicas que ocurre cuando a éstas se les agrega apoA-I (Triccerri et al., 1998)

Es de notar que el par de hélices Y central no es la única región de apoA-I que interactúa con la membrana. La mayor afinidad por membranas que presenta apoA-I en comparación con el péptido AI 77-120 indica que otras hélices también participan en la unión y contribuyen a la mayor afinidad. Sin embargo, el par de hélices 3-4 sería el único que se insertaría verticalmente en la membrana, lo que explicaría el hecho de que es la única región de apoA-I que es accesible a reactivos fotoactivables localizados profundamente en la bicapa lipídica como el ^{125}I -TID/PC (Corsico et al., 2001). El resto de las hélices de apoA-I muy probablemente interactúan horizontalmente con su eje mayor paralelo a la superficie de la membrana, y empotrando la cara hidrofóbica en la bicapa lipídica, como ha sido propuesto en las α -HDL esféricas.

Como se puede ver de la comparación de los esquemas V-3a y V-3b, el rearrreglo estructural del par de hélices Y central que ocurre en el proceso de inserción en la membrana sería el giro de las hélices por $\sim 180^\circ$ de manera que en solución acuosa interactúan por las caras hidrofóbicas y en la membrana por las caras hidrofílicas. Esta reorganización puede explicar el incremento en distancia entre los residuos homólogos y la consecuente disminución en eficiencia de homotransferencia de energía observada para W@104 y W@108 en presencia de vesículas. La distancia intermolecular entre estos residuos, que es de $\sim 5 \text{ \AA}$ en solución acuosa como pudo ser determinado aquí, se triplicaría en el estado insertado en la membrana explicando la desaparición del fenómeno de homotransferencia de energía. Según el modelo de fig. V-3b, este incremento en distancia también ocurriría para el residuo 93. Nuestros datos, sin embargo, no pueden negar ni confirmar que esto ocurra como se discutió en el capítulo IV. La mutante W@93 sufre un notable corrimiento de su emisión hacia el rojo indicando que el residuo 93 se encuentra en un entorno más polar cuando la proteína está unida a la membrana. Esto puede ser explicado por su localización en el límite entre ambas caras (hidrofílica e hidrofóbica) de la hélice, lo que podría resultar en una localización muy cercana a los grupos polares (y/o el agua) del interior del "hemicanal".

También esto explicaría la relativamente menor accesibilidad a los quenchers paramagnéticos lipídicos (Tempo-PC y n-doxil-PC) encontrada para esta mutante en comparación con W@104 y W@108.

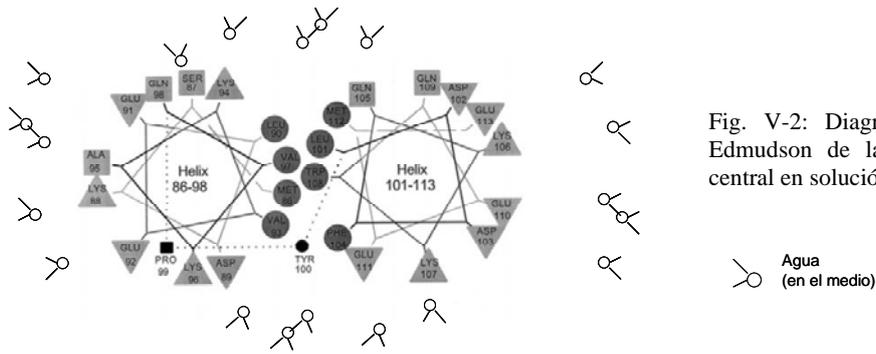


Fig. V-2: Diagrama de Edmundson de la región central en solución

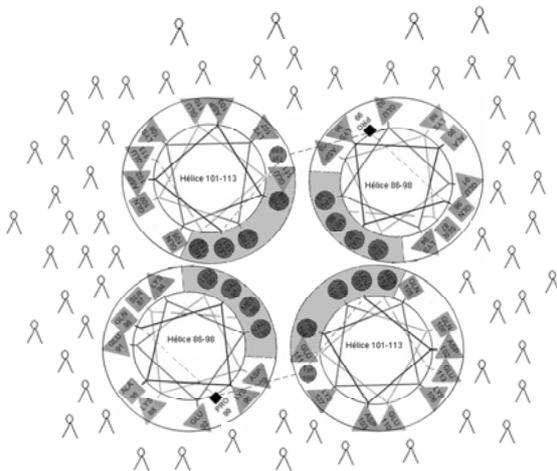


Fig. V-3a: diagrama de Edmundson que muestra la interacción de la región central formando dímeros en solución

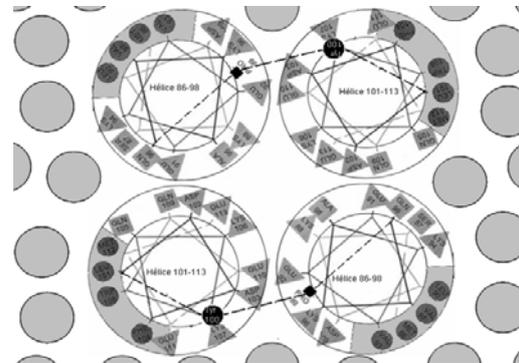


Fig. V-3b: diagrama de Edmundson que muestra la interacción de la región central formando en su inserción en membranas

Una observación realizada en este trabajo para la que no tenemos una explicación muy simple es la ausencia de influencia tanto de apoA-I como de AI 77-120 sobre la movilidad y ordenamiento de marcadores lipídicos en vesículas, ya que sería de esperar que el modo de inserción planteado afecte sensiblemente a la dinámica y ordenamiento de los lípidos circundantes. Ni diferentes marcadores de EPR localizados a diferente profundidad en la membrana ni la sonda Laurdan fueron capaces de detectar

algún cambio en la dinámica y ordenamiento de los lípidos. Recientemente, Sanchez y col (Sanchez et al., 2007) también reportaron la ausencia de efecto de apoA-I sobre la polarización generalizada de Laurdan en vesículas gigantes de POPC. En el caso de apoA-I, como la región central sería la única que se inserta verticalmente, su influencia podría estar "diluida" y probablemente también compensada por un efecto opuesto de el resto de las hélices que se empotrarían verticalmente. Para AI 77-120, sin embargo, esta "compensación" sería más improbable aunque su baja afinidad por la membrana podría resultar en la ausencia de efecto.

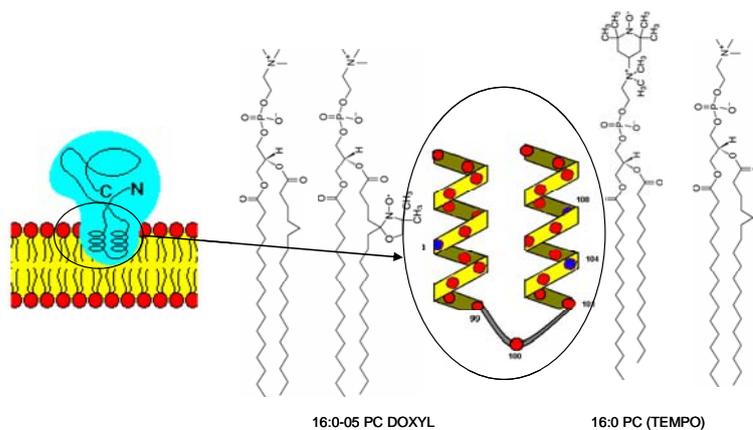


Fig. V-4a: Modelo de inserción en donde se muestra la interacción de la región central de apoA-I con los fosfolípidos, están indicado en el gráfico dos Doxil-PC utilizados.

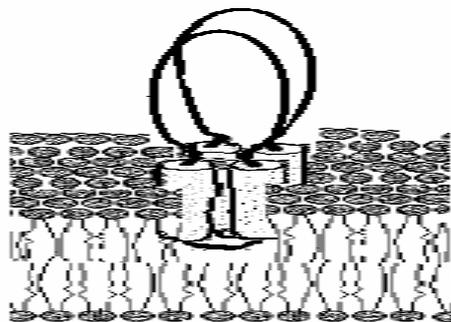


Fig. V-4b: Posible modelo de inserción en membrana del dominio de inserción intermolecular de apoA-I

b) Análisis funcional de la región central:

Los estudios realizados con el péptido AI 77-120, reproducen muchas de las características de la apoA-I, e indican así que las hélices Y centrales tienen una cierta independencia funcional del resto de la molécula de apoA-I. Como apoA-I, el péptido A-I 77-120 se une a vesículas y es accesible al reactivo fotoactivable ¹²⁵I-TID/PC.

Similarmente a lo que ocurre con apoA-I (Yokoyama et al., 1980), AI 77-120 tiene selectividad para unirse a membranas con colesterol. La afinidad de AI 77-120 por membranas, sin embargo, es bastante menor que para apoA-I, aunque es del mismo orden que la reportada para HDL discoidales. Esto indica que el par de hélices Y central no es el único que participa en la unión de apoA-I a vesículas, pero sugiere que probablemente sea la única región involucrada en la unión de HDL discoidales a membranas.

Las bases moleculares para la selectividad por colesterol pueden deberse a ciertas secuencias de reconocimiento que existen en las secuencias de apoA-I o de AI 77-120. Li y col (Li and Papadopoulos, 1998) postularon la existencia de ciertas secuencias consenso que existen en proteínas que unen colesterol (CRACS). La secuencia consenso propuesta es: -L/V-(X)₁₋₅-Y-(X)₁₋₅-R/K-, donde -(X)₁₋₅ representa de uno a cinco residuos de cualquier aminoácido. Se ha demostrado también que un análogo fotoactivable se une directamente a una de esas secuencias en el receptor de Benzodiazepina (Li et al., 2001) y que el péptido LWYIK no sólo tiene selectividad por membranas ricas en colesterol, sino también es capaz de inducir la reorganización de bicapas de PC/Col para producir dominios ricos en este compuesto (Epanand et al., 2003). El residuo de Tirosina (Y) en el centro de estos motivos sería esencial para establecer, presumiblemente, contacto de puentes de hidrógeno con el -OH del colesterol. Cinco de estas secuencias consenso existen en la secuencia de la apoA-I, estando una de ellas presentes entre los residuos 97-106 (-VQPYLDDFQK-) y por lo tanto podría ser el responsable de conferirle la selectividad por membranas al péptido AI 77-120, las otras cuatro secuencias (14-LATVYVDVLK-, 163-LAPYSDEL-, 189-LAEYHAK-, 233-LEEYTKK) podrían contribuir a la selectividad por membrana de la apoA-I.

AI 77-120 también presenta similar actividad que la apoA-I para promover la desorción de colesterol y facilitar su transporte a vesículas aceptoras, como se determinó utilizando un análogo fluorescente de colesterol o colesterol radiactivo (Toledo et al., 2004). Esto muy probablemente esté relacionado con el hecho de que el

colesterol parece ser excluido del entorno de las hélices 3-4 cuando estas se encuentran insertadas en la membrana, como lo indicaron los estudios de quenching con el análogo 3- β -doxil-colestano. También en HDL discoidales reconstituídas con apoA-I se ha reportado que el colesterol es excluido de la proximidad de la proteína en el borde del disco (Massey et al., 1985). No es muy simple de compatibilizar el hecho de que apoA-I y AI 77-120 presenten una preferencia por membranas ricas en colesterol y al mismo tiempo tengan la capacidad de catalizar su desorción. Si la selectividad por membranas ricas en colesterol se debe como fue propuesto por Li y colaboradores a las secuencias de reconocimiento de colesterol, estas deberían ser activas al momento de unirse la proteína a la membrana, pero en el estado unido, algún cambio conformacional debería inactivarla de manera que se pierda la afinidad por colesterol y se facilite su exclusión del entorno y su desorción de la membrana.

Recientemente, nuestro grupo también ha obtenido evidencias de que las hélices Y centrales de apoA-I juegan un rol importante en la interacción con la membrana celular y en desencadenar la movilización de depósitos intracelulares de colesterol hacia la membrana plasmática (Gonzalez et al., 2008).

4. Partículas discoidales de HDL

Dado que las HDL discoidales son eficientes aceptores de colesterol, y que son los primeros productos de lipidación, se estudió en este trabajo la estructura adquirida por la apo A-I en partículas discoidales. Hay gran consenso que la conformación de la apoA-I en complejos lipídicos es significativamente diferente a la que posee en el estado libre en solución, y que la proteína en este caso expone la cara hidrofóbica de al menos la mayoría de las hélices anfipáticas hacia las cadenas acílicas de los fosfolípidos. Esto se esquematiza en la figura I-17 de Introducción). Sin embargo, ha sido propuesto que algunas hélices de apo A-I podrían presentar configuraciones alternativas (unidas o despegadas del borde del disco), de manera de que un disco con el mismo número de moléculas pueda acomodar diferente cantidad de lípidos. Esto explicaría porqué el tamaño de los discos cambia de manera discreta. En particular para las repeticiones helicoidales tipo Y, experimentos previos de nuestro laboratorio con reactivos fotoactivables (Corsico et al., 2001) indicaron que ambos pares de hélices Y (el 3-4 y el 9-10) tienen un menor contacto con los lípidos del disco en comparación con el resto de las hélices. El hecho de que el par 3-4 pueda hallarse relativamente

"despegado" del borde del disco puede tener una gran implicancia para la formación del ramillete intermolecular de estas hélices que constituiría el postulado dominio de inserción en membranas.

Para que este ramillete intermolecular pueda ser formado en las HDL discoidales, se requiere que ambos pares de hélices 3-4 se encuentren cercanos entre sí. Esto sería posible en algunas configuraciones propuestas que se mencionaron en la Introducción, como la hebilla cabeza-cabeza de Tricerri y col (Tricerri et al., 2001) y el doble cinturón 2/5 de Silva y col (Silva et al., 2005b). Ambos trabajos fueron realizados en HDL discoidales reconstituídas con colato. En ambos casos, los datos no pudieron ser compatibilizados con una única configuración, por lo que se asumió la coexistencia de dos configuraciones. Tricerri y col. propusieron que la hebilla cabeza-cabeza coexiste con la hebilla cabeza-cola, mientras que Silva propone que el cinturón 2/5 coexiste con el 5/5.

Como mencionamos anteriormente, la unión de apoA-I (y de AI 77-120) a la membrana va acompañada de oligomerización y la región central parece jugar un rol en el proceso como se postuló para la formación del dominio de inserción intermolecular. Como la unión de apoA-I a la membrana es la etapa previa para la posterior formación de HDL discoidales en el proceso de micelización, una vez formado el dominio intermolecular de las hélices 3-4 que queda insertado en la membrana, esto podría restringir la configuración final en los discos. Esta posibilidad fue ensayada por medio de la reconstitución de HDL discoidales de DMPC por ambos métodos (con colato o micelización directa a la temperatura de transición). El análisis de los productos de crosslinking de lisinas y tripsinólisis indicó un perfil diferente (tanto por HPLC como por MALDI-TOF) para los discos formados por uno u otro método. Aunque muchos picos son comunes a ambos tipos de discos, algunos sólo están presentes en los espectros (o cromatogramas) correspondientes a los discos preparados con colato y ausentes en los preparados por micelización directa, sugiriendo que en estos últimos existiría sólo una de las configuraciones. La preparación de discos con las mutantes W@104 y W@108, y la detección en los mismos de homotransferencia de energía indicó que ésta ocurre en ambos tipos de discos, pero con una eficiencia bastante mayor en el caso de los discos generados por micelización directa, indicando que éstos tendrían preferiblemente (o exclusivamente) la configuración con las hélices 4 en estrecho contacto entre sí (esto es la hebilla cabeza-cabeza o el doble cinturón 2/5)

Si bien no hay datos sobre la configuración de apoA-I en discos naturales o generados por células, es razonable suponer que la misma restricción impuesta por la inserción del ramillete intermolecular de los pares de hélices 3-4 para la configuración de apo A-I en los discos generados por micelización pueda ocurrir para la generación de HDL discoidales por la interacción de apoA-I con la membrana celulares. Así, es muy probable que las HDL naturales también posean esta configuración única que permite la formación del dominio de inserción activo en los discos HDL.

La figura V-5 muestra que el ramillete intermolecular de las hélices Y centrales podría formarse tanto en la configuración de hebilla cabeza-cabeza como en el doble cinturón 2/5. Esto permitiría su inserción en membranas y explicaría varios hechos ya observados en la interacción de HDL discoidales con membranas como: 1) que esta región se encuentre relativamente "despegada" del borde del disco, pero que sea la única accesible al reactivo ^{125}I -TID/PC incorporado en vesículas (Corsico et al., 2001), 2) la similar afinidad por membranas que presentan las HDL discoidales y el péptido AI 77-120, y 3) la preferencia (o mayor afinidad) de las HDL discoidales por membranas ricas en colesterol y su desorción de las mismas, así como la inducción de pérdida de contenido acuoso de vesículas por las partículas discoidales (Tricerri et al., 1998), (Toledo et al., 2000)

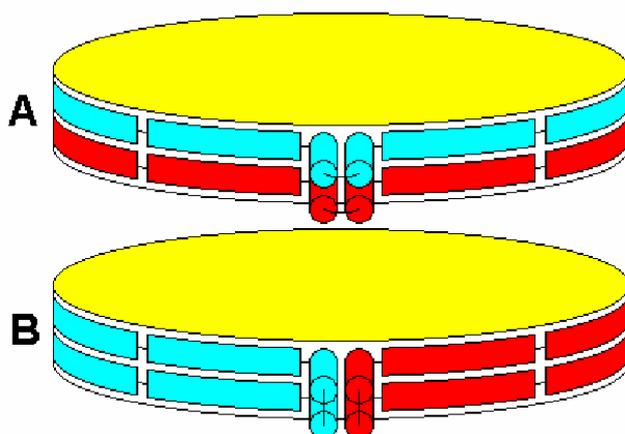


Figura V-5. Posibles modos de formación del ramillete intermolecular de las hélices Y centrales de apoA-I en HDL discoidales con 2 moléculas de apo A-I. A) de acuerdo con la configuración del doble cinturón 2/5, y B) de acuerdo con la configuración de la hebilla cabeza-cabeza

Por otro lado, también se estudió en este trabajo la movilidad y ordenamiento de la fase lipídica de las HDL reconstituídas con DMPC en comparación con vesículas multilamelares de este fosfolípido, usando EPR con marcadores lipídicos a diferentes profundidades de la bicapa lipídica. Se observó un efecto de la apoA-I bastante similar

al producido por sustancias que se intercalan en la bicapa lipídica como el colesterol, disminuyendo el ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas en el estado gel, e incrementándolo en el estado fluido. Jonas y colaboradores (Jonas et al., 1987) también observaron que apoA-I en las HDL discoidales produce un aumento en el grado de empaquetamiento en el estado fluido midiendo polarización de fluorescencia con difenilhexatrieno (DPH), y el corrimiento de la emisión de la sonda PRODAN.

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%, 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.

5. Conclusión General

Los datos obtenidos en este trabajo soportan la hipótesis central planteada originalmente de que el par de hélices Y central (3-4) de apoA-I constituye un dominio con independencia estructural y funcional del resto de la molécula de apoA-I, y nos permiten concluir y postular que:

- Este dominio participa en la unión de apoA-I (y de HDL discoidales) a membranas teniendo preferencia o mayor afinidad por membranas ricas en colesterol.
- La unión de este par de hélices a la membrana se produce por la inserción con el eje mayor de las hélices perpendicular a la superficie de la membrana y ocurriría sin grandes cambios en la estructura secundaria.
- Esta inserción no genera cambios apreciables en la dinámica y ordenamiento de los lípidos de la membrana, pero resultaría en la exclusión del colesterol del entorno del dominio, en la facilitación de la desorción del colesterol de la membrana y en consecuencia la transferencia a otros aceptores.
- El dominio de inserción "activo" sería un ramillete intermolecular formado por los dos pares de hélices 3-4 de un dímero de apoA-I, interactuando entre sí por las caras hidrofílicas de las hélices.
- En los dímeros de apoA-I en solución acuosa, este ramillete tendría la configuración inversa, es decir con las hélices interactuando entre sí mediante las caras hidrofóbicas.
- En las HDL discoidales, la interacción de las hélices de apoA-I con el borde del disco lipídico afecta a la dinámica y ordenamiento de los lípidos de manera diferencial, dependiendo de la profundidad en la bicapa lipídica, así como también del estado de fase de los lípidos.
- En las HDL discoidales de 2 moléculas de apoA-I reconstituídas con detergentes coexistirían al menos dos configuraciones de la apoA-I: Una de ellas con los 2 pares de hélices 3-4 en estrecho contacto entre sí, lo que permitiría la formación del ramillete intermolecular.
- Las HDL formadas por la reacción directa con vesículas fosfolipídicas en la transición de fase presentarían exclusivamente la configuración anterior que permitiría que se forme el ramillete intermolecular de las hélices 3-4 y consecuentemente el dominio de inserción activo.

Los datos obtenidos en estos estudios pueden tener una gran implicancia biológica y fisiológica ya que apoyan la idea de que la interacción de apoA-I con distintos entornos celulares pueda promover conformaciones específicas que regulen la exportación de lípidos y su función como factor protector antiaterosclerótico. En especial la postulación del ramillete intermolecular de las hélices Y centrales permite especular sobre que la afinidad de las HDL por la membrana pueda ser regulada por variables como el tamaño o el contenido de colesterol de los discos a través de la modulación de la formación del dominio de inserción "activo".

REFERENCIAS

- Ajees, A.A., Anantharamaiah, G.M., Mishra, V.K., Hussain, M.M., Murthy, H.M., 2006, Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2126-31.
- Anderson, D.W., Nichols, A.V., Forte, T.M., Lindgren, F.T., 1977, Particle distribution of human serum high density lipoproteins, *Biochim Biophys Acta*, 493, 55-68.
- Arnulphi, C., Jin, L., Tricerri, M.A., Jonas, A., 2004, Enthalpy-driven apolipoprotein A-I and lipid bilayer interaction indicating protein penetration upon lipid binding, *Biochemistry*, 43, 12258-64.
- Assmann, G., von Eckardstein, A., Funke, H., 1993, High density lipoproteins, reverse 12transport of cholesterol, and coronary artery disease. Insights from mutations, *Circulation*, 87, III 28-34.
- Badimon, J.J., Badimon, L., Galvez, A., Dische, R., Fuster, V., 1989, High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits, *Lab Invest*, 60, 455-61.
- Barrans, A., Jaspard, B., Barbaras, R., Chap, H., Perret, B., Collet, X., 1996, Pre-beta HDL: structure and metabolism, *Biochim Biophys Acta*, 1300, 73-85.
- Behling Agree, A.K., Tricerri, M.A., Arnvig McGuire, K., Tian, S.M., Jonas, A., 2002, Folding and stability of the C-terminal half of apolipoprotein A-I examined with a Cys-specific fluorescence probe, *Biochim Biophys Acta*, 1594, 286-96.
- Bergeron, J., Frank, P.G., Scales, D., Meng, Q.H., Castro, G., Marcel, Y.L., 1995, Apolipoprotein A-I conformation in reconstituted discoidal lipoproteins varying in phospholipid and cholesterol content, *J Biol Chem*, 270, 27429-38.
- Berliner, L.J. 2002.. Spin Labeling -The next milenium. In *Biological Magnetic Resonance*. Kluwer Acad. Publisher.
- Borhani, D.W., Rogers, D.P., Engler, J.A., Brouillette, C.G., 1997, Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12291-6.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1983, Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, *Annu Rev Biochem*, 52, 223-61.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1986, A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science*, 232, 34-47.

- Castro, G.R., Fielding, C.J., 1988, Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein, *Biochemistry*, 27, 25-9.
- Chattopadhyay, A., London, E., 1987, Parallax Method for Direct Measurement of Membrane Penetration Depth Utilizing Fluorescence Quenching by Spin-Labeled Phospholipids, *Biochemistry* 26, 39-45.
- Cho, K.H., Jonas, A., 2000, A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A-I, *J Biol Chem*, 275, 26821-7.
- Corsico, B., Toledo, J.D., Garda, H.A., 2001, Evidence for a central apolipoprotein A-I domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles, *J Biol Chem*, 276, 16978-85.
- Cullis, P., Hope, M.J., 1991, *Lipoproteins and Membrane*, *Biochemistry and Lipids*, D.E. Vance and J.Vance, editors. Elsevier Press, Amsterdam.
- Davidson, W.S., Arnvig-McGuire, K., Kennedy, A., Kosman, J., Hazlett, T.L., Jonas, A., 1999, Structural organization of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I: studies of tryptophan mutants, *Biochemistry*, 38, 14387-95.
- Davidson, W.S., Hilliard, G.M., 2003, The spatial organization of apolipoprotein A-I on the edge of discoidal high density lipoprotein particles: a mass spectrometry study, *J Biol Chem*, 278, 27199-207.
- Davidson, W.S., Silva, R.A., 2005, Apolipoprotein structural organization in high density lipoproteins: belts, bundles, hinges and hairpins, *Curr Opin Lipidol*, 16, 295-300.
- de Beer, M.C., Durbin, D.M., Cai, L., Jonas, A., de Beer, F.C., van der Westhuyzen, D.R., 2001a, Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI, *J Lipid Res*, 42, 309-13.
- de Beer, M.C., Durbin, D.M., Cai, L., Mirocha, N., Jonas, A., Webb, N.R., de Beer, F.C., van Der Westhuyzen, D.R., 2001b, Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high density lipoprotein by scavenger receptor BI, *J Biol Chem*, 276, 15832-9.
- Epand, R.M., Sayer, B.G., Epand, R.F., 2003, Peptide-induced formation of cholesterol-rich domains, *Biochemistry*, 42, 14677-89.
- Fielding, C.J., Fielding, P.E., 1981, Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin:cholesterol acyltransferase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 3911-4.

- Fielding, C.J., Fielding, P.E., 2001, Cellular cholesterol efflux, *Biochim Biophys Acta*, 1533, 175-89.
- Fielding, P.E., Fielding, C.J., 1995, Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol, *Biochemistry*, 34, 14288-92.
- Fielding, P.E., Nagao, K., Hakamata, H., Chimini, G., Fielding, C.J., 2000, A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1, *Biochemistry*, 39, 14113-20.
- Fredrickson, D.S., 1964, The Inheritance of High Density Lipoprotein Deficiency (Tangier Disease), *J Clin Invest*, 43, 228-36.
- Garda, H.A., Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2002, Structure of apolipoprotein III in discoidal lipoproteins. Interhelical distances in the lipid-bound state and conformational change upon binding to lipid, *J Biol Chem*, 277, 19773-82.
- Gill, S.C., von Hippel, P.H., 1989, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. , *Anal. Biochem.*, 182, 319-326.
- Goldman, S.A., Bruno, G.V., Polnaszke, C.F., Freed, J.H., 1972, Local dynamics of polymers in solution by spin label ESR. *J.Phys.Chem.*, 56, 716-735.
- Gonzalez, M.C., Toledo, J.D., Tricerri, M.A., Garda, H.A., 2008, The central type Y amphipathic alpha-helices of apolipoprotein AI are involved in the mobilization of intracellular cholesterol depots, *Arch Biochem Biophys*, 473, 34-41.
- Gordon, D.J., 1990, Role of circulating High Density Lipoprotein and Triglycerides in coronary artery disease: risk and prevention. *Endocrinol Metab. Clin. North. Am.*, 19, 299.
- Gursky, O., Atkinson, D., 1996, Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2991-5.
- Hamman, B.D., Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Traut, R.R., Jameson, D.M., 1996, Dimer/monomer equilibrium and domain separations of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12, *Biochemistry*, 35, 16680-6.
- Hwang, J.S., Mason, R.P., Hwang, L.P., Freed, J.H., 1975, Electron spin Resonance studies of anisotropic rotational reorientation and slow tumbling in liquid and frozen media III. Perdeuterated 2,2,6,6, tetramethyl-4-piperidone N-oxide and an analysis of fluctuating torques. *J.Phys. Chem*, 79, 489.
- Ingram, D.J.E., 1969, Biological and Biochemistry application of electron spin resonance. London Publisher, Adam Hilger Ltd

- Ji, Y., Jonas, A., 1995, Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins, *J Biol Chem*, 270, 11290-7.
- Jonas, A., 2000, Lecithin cholesterol acyltransferase, *Biochim Biophys Acta*, 1529, 245-56.
- Jonas, A., Kezdy, K.E., Wald, J.H., 1989, Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs, *J Biol Chem*, 264, 4818-24.
- Jonas, A., Wald, J.H., Toohill, K.L., Krul, E.S., Kezdy, K.E., 1990, Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins, *J Biol Chem*, 265, 22123-9.
- Jonas, A., Zorich, N.L., Kezdy, K.E., Trick, W.E., 1987, Reaction of discoidal complexes of apolipoprotein A-I and various phosphatidylcholines with lecithin cholesterol acyltransferase. Interfacial effects, *J Biol Chem*, 262, 3969-74.
- Joyce, C., Freeman, L., Brewer, H.B., Jr., Santamarina-Fojo, S., 2003, Study of ABCA1 function in transgenic mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 965-71.
- Kelley, L.A., MacCallum, R.M., Sternberg, M.J., 2000, Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM, *J Mol Biol*, 299, 499-520.
- Krimbou, L., Hajj Hassan, H., Blain, S., Rashid, S., Denis, M., Marcil, M., Genest, J., 2005, Biogenesis and speciation of nascent apoA-I-containing particles in various cell lines, *J Lipid Res*, 46, 1668-77.
- Kunitake, S.T., Chen, G.C., Kung, S.F., Schilling, J.W., Hardman, D.A., Kane, J.P., 1990, Pre-beta high density lipoprotein. Unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis, *Arteriosclerosis*, 10, 25-30.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature(London)*, 227, 680.
- Lakowicz, J.R., 1999, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press. Segunda Edición, 1-698.
- Lederberg, E.M., Cohen, S.N., 1974, Transformation of *Salmonella typhimurium* by Plasmid Deoxyribonucleic Acid, *J. Bacteriol*, 119, 1072-4.
- Leroy, A., Toohill, K.L., Fruchart, J.C., Jonas, A., 1993, Structural properties of high density lipoprotein subclasses homogeneous in protein composition and size, *J Biol Chem*, 268, 4798-805.
- Letizia, J.Y., Phillips, M.C., 1991, Effects of apolipoproteins on the kinetics of cholesterol exchange, *Biochemistry*, 30, 866-73.

- Lewis, G.F., Rader, D.J., 2005, New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport, *Circ Res*, 96, 1221-32.
- Li, H., Lyles, D.S., Thomas, M.J., Pan, W., Sorci-Thomas, M.G., 2000, Structural determination of lipid-bound ApoA-I using fluorescence resonance energy transfer, *J Biol Chem*, 275, 37048-54.
- Li, H., Papadopoulos, V., 1998, Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern, *Endocrinology*, 139, 4991-7.
- Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G., Papadopoulos, V., 2001, Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1267-72.
- Li, L., Chen, J., Mishra, V.K., Kurtz, J.A., Cao, D., Klon, A.E., Harvey, S.C., Anantharamaiah, G.M., Segrest, J.P., 2004, Double belt structure of discoidal high density lipoproteins: molecular basis for size heterogeneity, *J Mol Biol*, 343, 1293-311.
- Lodish, H., Berk, A. Matsudaira, P., Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, S. L., Darnell, J.. 2005. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman Ed
- Luna-Chavez, C., Gong, E., Forte, T., AV, N., 1994, Sodium oleate-facilitated reassembly of apolipoprotein A-I with phosphatidylcholine, *Biochim Biophys Acta.*, 1215, 141-9.
- Lund-Katz, S., Hammerschlag, B., Phillips, M.C., 1982, Kinetics and mechanism of free cholesterol exchange between human serum high- and low-density lipoproteins, *Biochemistry*, 21, 2964-9.
- Maiorano, J.N., Davidson, W.S., 2000, The orientation of helix 4 in apolipoprotein A-I-containing reconstituted high density lipoproteins, *J Biol Chem*, 275, 17374-80.
- Marcel, Y.L., Kiss, R.S., 2003, Structure-function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations, *Curr Opin Lipidol*, 14, 151-7.
- Marcel, Y.L., Provost, P.R., Koa, H., Raffai, E., Dac, N.V., Fruchart, J.C., Rassart, E., 1991, The epitopes of apolipoprotein A-I define distinct structural domains including a mobile middle region, *J Biol Chem*, 266, 3644-53.

- Martinez, L.O., S. Jacquet, F.T., Collet, X., Perret, B., Barbaras*, R., 2004, New insight on the molecular mechanisms of high-density lipoprotein cellular interactions, *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 2343–2360.
- Massey, J.B., She, H.S., Gotto, A.M., Jr., Pownall, H.J., 1985, Lateral distribution of phospholipid and cholesterol in apolipoprotein A-I recombinants, *Biochemistry*, 24, 7110-6.
- Matz, C.E., Jonas, A., 1982a, Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions, *J Biol Chem*, 257, 4535-40.
- Matz, C.E., Jonas, A., 1982b, Reaction of human lecithin cholesterol acyltransferase with synthetic micellar complexes of apolipoprotein A-I, phosphatidylcholine, and cholesterol, *J Biol Chem*, 257, 4541-6.
- McGuire, K.A., Davidson, W.S., Jonas, A., 1996, High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I, *J Lipid Res*, 37, 1519-28.
- McMillan, J.A. 1975. *Paramagnetismo electronico*. Washington: The General Secretariat of the Organization of Amer, editor. 115 p.
- Moens, P.D., Helms, M.K., Jameson, D.M., 2004, Detection of tryptophan to tryptophan energy transfer in proteins, *Protein J*, 23, 79-83.
- Morse II, P.D., 1986, Determining intracellular viscosity from the rotational motion of spin labels *Methods in Enzymology*, 127, 239-249.
- Nolde, D.E., Sobol, A.G., Pluzhnikov, K.A., Grishin, E.V., Arseniev, A.S., 1995, Three-dimensional structure of ectatomin from *Ectatomma tuberculatum* ant venom, *J Biomol NMR*, 5, 1-13.
- O'Connell, B.J., Genest, J., Jr., 2001, High-density lipoproteins and endothelial function, *Circulation*, 104, 1978-83.
- Oram, J.F., 2000, Tangier disease and ABCA1, *Biochim Biophys Acta*, 1529, 321-30.
- Oram, J.F., 2002, ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking, *Curr Opin Lipidol*, 13, 373-81.
- Oram, J.F., Lawn, R.M., 2001, ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol, *J Lipid Res*, 42, 1173-9.
- Palgunachari, M.N., Mishra, V.K., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Adeyeye, S.O., Alluri, S., Anantharamaiah, G.M., Segrest, J.P., 1996, Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid

- affinity. Implications for HDL assembly, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16, 328-38.
- Phillips, J.C., Wriggers, W., Li, Z., Jonas, A., Schulten, K., 1997, Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks, *Biophys J*, 73, 2337-46.
- Pluzhnikov, K., Nosyreva, E., Shevchenko, L., Kokoz, Y., Schmalz, D., Hucho, F., Grishin, E., 1999, Analysis of ectatomin action on cell membranes, *Eur J Biochem*, 262, 501-6.
- Remaley, A.T., Hoeg, J.M., 1995, Polarized secretion of apoA-I and apoA-II by transfected MDCK cells, *J Lipid Res*, 36, 407-13.
- Rogers, D.P., Roberts, L.M., Lebowitz, J., Engler, J.A., Brouillette, C.G., 1998, Structural analysis of apolipoprotein A-I: effects of amino- and carboxy-terminal deletions on the lipid-free structure, *Biochemistry*, 37, 945-55.
- Rothblat, G.H., Mahlberg, F.H., Johnson, W.J., Phillips, M.C., 1992, Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux, *J Lipid Res*, 33, 1091-7.
- Sanchez, S.A., Tricerri, M.A., Gratton, E., 2007, Interaction of high density lipoprotein particles with membranes containing cholesterol, *J Lipid Res*, 48, 1689-700.
- Scanu, A.M., Tardieu, A., 1971, Temperature transitions of lipid mixtures containing cholesterol esters. Relevance to the structural problem of serum high density lipoprotein, *Biochim Biophys Acta*, 231, 170-4.
- Schägger, H., Jagow, G.v., 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem*, 166, 368-79.
- Seelig, J., 1970, A spin label study of oriented liquid crystal (a model system for bilayer membranes) *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 3881.
- Segrest, J.P., Jones, M.K., De Loof, H., Brouillette, C.G., Venkatachalapathi, Y.V., Anantharamaiah, G.M., 1992, The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function, *J Lipid Res*, 33, 141-66.
- Segrest, J.P., Jones, M.K., Klon, A.E., Sheldahl, C.J., Hellinger, M., De Loof, H., Harvey, S.C., 1999, A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein, *J Biol Chem*, 274, 31755-8.

- Sembrook, Russell. 2001. *Molecular Cloning and Laboratory Manual*: Ed. CSHL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Silva, R.A., Hilliard, G.M., Fang, J., Macha, S., Davidson, W.S., 2005a, A three-dimensional molecular model of lipid-free apolipoprotein A-I determined by cross-linking/mass spectrometry and sequence threading, *Biochemistry*, 44, 2759-69.
- Silva, R.A., Hilliard, G.M., Li, L., Segrest, J.P., Davidson, W.S., 2005b, A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins, *Biochemistry*, 44, 8600-7.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175, 720-31.
- Small, D., 1988, George Lyman Duff memorial lecture. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry., *Arteriosclerosis*., 8, 103-29.
- Stampfer, M.J., Sacks, F.M., Salvini, S., Willett, W.C., Hennekens, C.H., 1991, A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction, *N Engl J Med*, 325, 373-81.
- Swaney, J.B., Chang, B.C., 1980, Thermal dependence of apolipoprotein A-I-phospholipid recombination, *Biochemistry*, 19, 5637-44.
- Toledo, J.D., Prieto, E.D., Gonzalez, M.C., Soulages, J.L., Garda, H.A., 2004, Functional independence of a peptide with the sequence of human apolipoprotein A-I central region, *Arch Biochem Biophys*, 428, 188-97.
- Toledo, J.D., Tricerri, M.A., Corsico, B., Garda, H.A., 2000, Cholesterol flux between lipid vesicles and apolipoprotein AI discs of variable size and composition, *Arch Biochem Biophys*, 380, 63-70.
- Toumadje, A., Alcorn, S.W., Johnson, W.C., Jr., 1992, Extending CD spectra of proteins to 168 nm improves the analysis for secondary structures, *Anal Biochem*, 200, 321-31.
- Tricerri, A., Corsico, B., Toledo, J.D., Garda, H.A., Brenner, R.R., 1998, Conformation of apolipoprotein AI in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol, *Biochim Biophys Acta*, 1391, 67-78.
- Tricerri, M.A., Behling Agree, A.K., Sanchez, S.A., Bronski, J., Jonas, A., 2001, Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein

- disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments, *Biochemistry*, 40, 5065-74.
- Tricerri, M.A., Behling Agree, A.K., Sanchez, S.A., Jonas, A., 2000, Characterization of apolipoprotein A-I structure using a cysteine-specific fluorescence probe, *Biochemistry*, 39, 14682-91.
- Tricerri, M.A., Sanchez, S.A., Arnulphi, C., Durbin, D.M., Gratton, E., Jonas, A., 2002, Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles, *J Lipid Res*, 43, 187-97.
- Tricerri, M.A., Toledo, J.D., Sanchez, S.A., Hazlett, T.L., Gratton, E., Jonas, A., Garda, H.A., 2005, Visualization and analysis of apolipoprotein A-I interaction with binary phospholipid bilayers, *J Lipid Res*, 46, 669-78.
- von Eckardstein, A., Huang, Y., Wu, S., Funke, H., Nosedá, G., Assmann, G., 1995, Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 691-703.
- Wang, N., Silver, D.L., Thiele, C., Tall, A.R., 2001, ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein, *J Biol Chem*, 276, 23742-7.
- Weber, G., 1960, Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in tyrosine, tryptophan and related compounds, *Biochem J*, 75, 335-45.
- Williams, K.J., Tabas, I., 1995, The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 551-61.
- Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Agard, D.A., 1991, Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E, *Science*, 252, 1817-22.
- Yadava, A., Ockenhouse, C.F., 2003, Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems, *Infect Immun*, 71, 4961-9.
- Yokoyama, S., 2006, Assembly of high-density lipoprotein, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 20-7.
- Yokoyama, S., Fukushima, D., Kupferberg, J.P., Kezdy, F.J., Kaiser, E.T., 1980, The mechanism of activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I and an amphiphilic peptide, *J Biol Chem*, 255, 7333-9.