

INDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

- **Introducción** Pág. 15
- **El rol del transporte de lípidos y su implicancia en enfermedades cardiovasculares** Pág. 21
- **Transporte reverso de colesterol** Pág. 22
- **Distintas conformaciones de las HDL**
 - HDL- esféricas Pág. 25
 - Pre- β -1 HDL Pág. 26
 - Pre- β -2- HDL Discoidales Pág. 27
- **Aspectos fisiopatológicos en el transporte de colesterol** Pág. 28
- **Proteína mayoritaria en las HDL: Apolipoproteína A-I** Pág. 31
- **Interacción de apoA-I y de complejos lipoproteicos de apoA-I con membranas lipídicas.** Pág. 35
- **Conformación de la apoA-I en complejos discoidales** Pág. 39
- **La región central de la apoA-I** Pág. 43

CAPÍTULO II:

- **Hipótesis central y objetivos generales del trabajo** Pág. 46

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

- **1- Obtención de distintas formas de Apo A-I**
 - 1.1- Purificación de apoA-I de plasma Pág. 50
 - 1.2- Obtención de péptido central de apoA-I Pág. 51
 - 1.3- Obtención de apoA-I con secuencia nativa (Wild type) ó mutada mediante expresión a partir de cultivos bacterianos.

Técnicas de biología molecular	Pág. 52
Tratamiento de bacterias para hacerlas competentes	Pág. 54
Transformación	Pág. 54
Construcción de los mutantes de apoA-I	Pág. 55
Expresión y purificación	Pág. 58
Eliminación de la secuencia de fusión mediante corte con enzima proteolítica	Pág. 59
• 2- Técnicas electroforéticas	
▪ 2.1- Geles de agarosa	Pág. 60
▪ 2.2- Geles de poliacrilamida	Pág. 61
• 3- Determinación de concentración de proteína	Pág. 63
• 4- Técnicas espectroscópicas	
▪ 4.1- Resonancia Electrónica Paramagnética (EPR)	Pág. 64
- Efecto de movilidad en los espectros de EPR	Pág. 68
- Marcadores de spin	Pág. 70
- Parámetro de orden	Pág. 72
- Método experimental utilizado	Pág. 73
▪ 4.2- Fluorescencia	Pág. 74
- Anisotropía de fluorescencia	Pág. 79
- Transferencia de energía	Pág. 80
- Quenching o apagado de fluorescencia	Pág. 81

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

• Parte A	
- Rol e independencia funcional de las hélices Y centrales de apo A-I en la interacción con membranas.	
Estudios con un péptido sintético	Pág. 85
- Afinidad de A-I 77-120 por membranas fosfolipídicas.	Pág. 85

- Marcación por reactivos fotoactivables	Pág. 88
- Cambios estructurales de AI 77-120 en la interacción con membranas: estudios de estructura secundaria por dicroísmo circular	Pág. 89
- Estudios de estructura oligomérica usando agentes entrecruzantes (crosslinkers)	Pág. 91
- Capacidad de AI 77-120 para formar complejos lipoproteicos	Pág. 93
- Independencia funcional de AI 77-120. Catálisis de la transferencia de colesterol o su análogo dehidroergosterol entre vesículas fosfolipídicas	Pag. 95
- Transferencia de dehidroergosterol entre vesículas	Pág. 95
- Transferencia de 3H-colesterol desde vesículas de carga negativa a vesículas neutras	Pág. 96
- Conclusiones parciales	Pág. 99
• Parte B	
- Estudios de Resonancia de Electrónica Paramagnética	Pág. 102
- Influencia de la unión de apoA-I y AI 77-120 a vesículas fosfolipídicas sobre la movilidad de los lípidos de la membrana	Pág. 102
- Mediciones del ordenamiento de los lípidos en complejos lipoproteicos de apoA-I con DMPC generados por la micelización de vesículas en la transición de fase	Pág. 105
• Parte C	
- Estudios con mutantes de apoA-I con un único residuo de triptofano (Trp)	Pág. 110
- Mutagénesis sitio-dirigida para la obtención de las mutantes de apoA-I de Trp único	Pág. 110
- Expresión, purificación y clivaje de las proteínas de fusión de los mutantes anteriores	Pág. 111
- Expresión y purificación	Pág. 113
- Corte con enzima proteolítica	Pág.114
1- Caracterización de las mutantes obtenidas	
1.a) Dicroísmo circular	Pág.116

1.b) Capacidad de las proteínas mutantes con único Trp para microsolubilizar vesículas de DMPC y generar complejos lipoproteicos	Pág.116
2- Estudios por espectroscopía de fluorescencia	
2.a) Estudios de fluorescencia en el estado libre de lípidos. Evidencias de que las hélices Y centrales participan en la oligomerización de apoA-I	Pág.118
Apéndice I	Pág.126
2.b) Conformación de la región central de apoA-I en el estado unido a membranas	Pág.127
2.c) Topología de inserción en la membrana de las hélices Y centrales. Mediciones de extinción de la fluorescencia de Trp por extinguidores (quenchers) paramagnéticos localizados a diferente profundidad en la bicapa lipídica	Pág.128
2.d) Configuración de apoA-I en complejos lipoproteicos discoidales. Evidencias de que la configuración es dependiente del método de reconstitución	Pág.138

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

1. Obtención y caracterización de las mutantes	Pág.147
2. Conformación de la región central en la proteína libre de lípidos (lipid-free)	Pág.149
3. Interacción de la lipid-free con membranas	Pág.151
a) Análisis estructural	Pág.151
b) Análisis funcional de la región central	Pág.156
4. Partículas discoidales de HDL	Pág.157
5. Conclusión General	Pág.162

REFERENCIAS	Pág.164
--------------------	---------