

194
lej

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

Purificación y Caracterización de una Proteína
Facilitadora del Recambio de Colesterol en la
Membrana Plasmática de la Célula Muscular Cardíaca.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JUAN DIEGO SANTIAGO GARCIA

México, D.F.

1 9 8 8



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

| | Pag. |
|--|------|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCION | 3 |
| 1. Generalidades sobre el Colesterol | 3 |
| a) Estructura y Propiedades del Colesterol..... | 3 |
| b) Importancia del Colesterol en el Funciona- miento Celular | 5 |
| 2. Metabolismo de las Lipoproteínas y su Función ... | 9 |
| a) Clasificación y Formación de las Lipoproteínas | 9 |
| b) Endocitosis Mediada por Receptores y Catabo- lismo de las LDL | 12 |
| c) Defectos Genéticos en los Receptores para LDL y Aterosclerosis | 15 |
| 3. Transferencia y Recambio de Colesterol Libre y Fosfolípidos | 20 |
| a) Consideraciones Generales y Mecanismos | 20 |
| b) Transferencia y Recambio de Colesterol y otros Lípidos entre Liposomas | 22 |
| c) Transferencia y Recambio de Colesterol entre Lipoproteínas | 25 |
| d) Transferencia y Recambio de Colesterol en Eritrocitos | 26 |
| e) Transferencia y Recambio de Colesterol en Células Procariontes | 28 |

| | |
|--|----|
| f) Transferencia y Recambio de Colesterol en Monocapas Celulares en Cultivo | 29 |
| g) Aporte de Colesterol de las HDL a Células Esteroidogénicas | 31 |
| h) Remoción del Colesterol de los Tejidos y su Transporte Reverso al Hígado | 32 |
| i) Mecanismos que Regulan la Homeostasis del Colesterol | 34 |
| 4. Proteínas Acarreadoras de Esteroles y Otros Lípidos | 37 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 42 |
| III. MATERIALES Y METODOS | 44 |
| 1. Químicos | 44 |
| 2. Aislamiento de la fracción de sarcolema cardíaco | 44 |
| 3. Solubilización de la fracción sarcolemal y cromatografía en columna | 46 |
| 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas | 47 |
| 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS | 48 |
| 6. Incorporación de colesterol a geles nativos | 48 |
| 7. Incorporación de colesterol a liposomas reconstituidos con cada una de las fracciones | 49 |
| 8. Obtención de anticuerpos anti-fracción CI | 50 |
| 9. Reacciones de inmunoprecipitación en gel | 50 |
| 10. Determinación de proteínas | 51 |

| | |
|----------------------------------|----|
| IV. RESULTADOS Y DISCUSION | 52 |
| V. CONCLUSIONES | 67 |
| VI. PERSPECTIVAS | 68 |
| VII. REFERENCIAS | 70 |
| ANEXO | 85 |

RESUMEN

Han sido purificadas diversas proteínas que aceleran el recambio de lípidos entre la fracción soluble y microsomal del hígado de rata. También se han descrito proteínas que facilitan el recambio de lípidos entre las lipoproteínas del plasma sanguíneo, y entre estas mismas lipoproteínas y algunos tipos celulares. Sin embargo, a pesar de que existen evidencias de cómo el colesterol es integrado de sus sitios de síntesis a la membrana plasmática y del recambio pasivo de este esteroide entre los diferentes tipos de membranas, en la actualidad es totalmente desconocida la existencia de mecanismos de regulación de las concentraciones de colesterol en las membranas biológicas.

Con base en experimentos iniciales realizados en nuestro laboratorio, el propósito de la presente tesis fue el investigar la existencia de moléculas intrínsecas de la membrana plasmática de la célula muscular cardíaca o sarcolema, capaces de transferir colesterol entre los diferentes compartimientos celulares.

La fracción sarcolema se aisló por centrifugación diferencial y centrifugación en gradientes de sacarosa a partir de músculo cardíaco de conejo. Esta fracción fue solubilizada con Triton X-100 y centrifugada. El sobrenadante, se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de colesterol hemisuccinato-agarosa.

Al emplear un sistema de geles de poliacrilamida en condiciones nativas, se observó que una de las proteínas que eluye de la columna con KCl 100 mM fue capaz de unir colesterol al encontrarse embebida en el gel. Esta proteína se recuperó de los

geles nativos y se reconstituyó en membranas artificiales, donde se observó que es capaz de transferir colesterol del medio al interior de la membrana.

El análisis electroforético en geles con SDS indica que esta proteína tiene un peso molecular aproximado de 73 kilodaltones (kDa).

El presente trabajo, constituye el primer reporte de una proteína aislada de la membrana plasmática capaz de recambiar colesterol entre el medio y la membrana plasmática de la célula muscular cardíaca. Actualmente, nos encontramos explorando la presencia de esta proteína en membranas de otros tipos celulares.

I. INTRODUCCION:

1. GENERALIDADES SOBRE EL COLESTEROL.

a) Estructura y Propiedades del Colesterol

El compuesto conocido ahora como colesterol, fue descrito por primera vez a fines del siglo XVIII por De Fourcroy, quien lo aisló a partir de los calculos biliares (1). Posteriormente en 1816 Chevreul, introdujo el termino colesterina (del griego chole=bilis y steros=sólido) para designar a esta sustancia. Hacia 1835, la colesterina se encontró en la sangre humana, en el cerebro y otros tejidos; por lo tanto se fue reconociendo gradualmente como un constituyente normal de todas las células animales y de varias secreciones, así como un componente de ciertos depósitos patológicos (1). En 1843, Vogel lo encontró en arterias ateromatosas. Berthelot en 1859 demostró que la colesterina era un alcohol y preparó ésteres de éste; mientras que Hürtle aisló colesterol oleato y colesterol palmitato del suero, con base en lo cual años más tarde se demostró que el colesterol presente en los ateromas estaba en forma esterificada (1).

Sin embargo, hay quien menciona que este compuesto era ya conocido por los Egipcios y los Griegos, en los cálculos biliares, y fueron estos últimos quienes lo nombraron colesterol (2).

Después de varios años de investigación se estableció la estructura química de este esterol. La molécula de colesterol es un sistema condensado de cuatro anillos (figura 1); tres anillos de seis carbonos (A,B,C), y un anillo de cinco carbonos (D), tiene una cadena lateral en el carbono 17, y dos grupos metilo (C-18 y C-19) unidos a los carbonos 13 y 10 respectivamente,

conocidos como grupos metilo angulares; además tiene una doble ligadura en la posición 5 y un grupo OH en el carbono 3. Cabe señalar que los estudios de cristalografía con rayos X han revelado que el colesterol no es una molécula plana, si no que tiene cierto grosor, y sus dimensiones son 7.2 X 4.5 X 20 A (1).

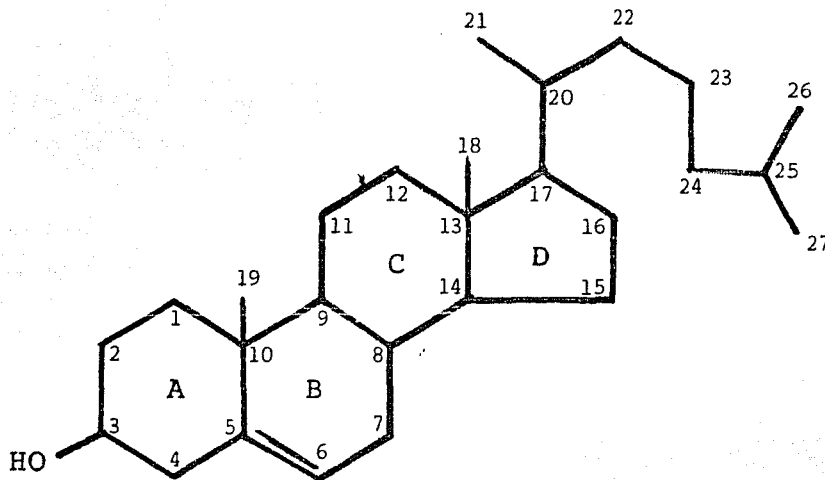


Figura 1. Estructura del colesterol.

Dentro de sus principales propiedades y constantes físicas podemos mencionar: es un compuesto de $C_{27}H_{46}O$, cuyo nombre sistemático es Colest-5-en-3 β -ol; tiene un peso molecular de 386.64, su porcentaje de carbono es del 83.87 %, hidrogeno 11.99 % y oxigeno 4.14 %; densidad 1.03 en forma monohidratada, y 1.052 en forma anhidra; es practicamente insoluble en agua (3×10^{-6} M), y soluble en solventes orgánicos como el éter, cloroformo, benceno y otros.

b) Importancia del Colesterol en el Funcionamiento Celular

El significado funcional del colesterol, uno de los principales constituyentes de las membranas de células eucariontes ha recibido un gran interés en los últimos años. Numerosos estudios en que se han aplicado varias técnicas, han establecido que el colesterol modula la estructura y propiedades dinámicas de las membranas. Algunos de estos estudios han demostrado que el colesterol puede tener efectos en la movilidad de lípidos en las membranas biológicas (3-5). En general se ha aceptado que en las membranas el colesterol tiene un efecto "solidificante" o "condensante" a temperaturas por arriba del estado de transición de la mayoría de los lípidos, y un efecto "fluidizante" a temperaturas por debajo de dichas temperaturas de transición. Estos cambios en la fluidez de la membrana dados por el colesterol, se piensa que juegan un papel importante en la regulación de las funciones membranales, y se han relacionado con fenómenos tan variados como: el transporte de azúcares (6,7); el transporte activo (8,9), la actividad de proteínas de membrana, tanto enzimas como acarreadores (6-13); permeabilidad (14-16); inmunológica (17), y otros.

En el caso del eritrocito se sabe que la fluidez de membrana, puede regular: el transporte de oxígeno, el cual se reduce al incrementarse el colesterol en la membrana; el transporte mediado por acarreadores. También interviene en: la respuesta inmunológica; la capacidad de agregación intercelular; la interacción con proteínas del plasma y la fusión celular (3). Por otro lado, en la superficie interior, la interacción entre el citoesqueleto y otros componentes de membrana puede afectarse por cambios en la

fluidez de membrana (3). Así también, se ha visto que los eritrocitos incubados con colesterol tienen mayor resistencia a la hemólisis por choque hipotónico y a alteraciones mecánicas de la membrana (3).

La relevancia del colesterol en términos de permeabilidad es evidente; estudios en sistemas modelo y membranas biológicas de microorganismos, eritrocitos, y otros tipos celulares, han establecido que el colesterol reduce la permeabilidad a los no electrolitos a temperaturas fisiológicas (7,14,16). Ciertos procesos de difusión facilitada a través de la membrana del eritrocito se aumentan por la depleción del colesterol; mientras que otros son inhibidos (7). El transporte de Na^+ y K^+ sensible a ouabaina se aumenta por la depleción del colesterol (11,14); mientras que el enriquecimiento con este esterol al parecer no tiene efecto en dicho proceso. Adicionalmente se ha encontrado que el transporte pasivo de Na^+ insensible a ouabaina, es inhibido por un enriquecimiento de colesterol en las membranas (14). No obstante, la mayoría de los trabajos establecen un efecto inhibitorio del colesterol, Grunze y cols. (7), han reportado que el colesterol tiene un efecto dual en procesos de transporte simple y mediado en eritrocitos de humanos.

Por otro lado, se ha encontrado que los niveles de colesterol en la membrana plasmática pueden modular la actividad de algunas enzimas como son: la ATPasa de Na^+/K^+ y la ATPasa de (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Para estas enzimas se ha observado que los incrementos de colesterol en la membrana tienen un efecto inhibitorio; mientras que, la depleción de colesterol estimula la actividad de dichas enzimas; es decir hay una relación inversa entre el con-

tenido de colesterol en la membrana y la actividad enzimática (8,11-13). Respecto a la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico existe controversia, en vista de evidencias que sostienen que los incrementos en la cantidad de colesterol en el retículo causan un decremento proporcional en la actividad (10,18); mientras que Warren y cols. (19), encontraron que el colesterol no tiene ningún efecto en la actividad de la ATPasa reconstituida con mezclas de fosfatidilcolina/colesterol a temperaturas mayores de 30°C. Sin embargo, estos mismos autores demostraron que a temperaturas menores de 30°C, el colesterol aparentemente inhibe la actividad de la enzima.

Se han tratado de establecer los posibles mecanismos por los cuales el colesterol ejerce su efecto regulatorio en estas enzimas, al respecto se han propuesto varias alternativas: una de ellas sostiene, con base en estudios de resonancia magnética nuclear, que el efecto inhibitorio del colesterol está relacionado con la disminución del movimiento molecular dentro de la bicapa (8); otra propone que una interacción directa entre el colesterol y la ATPasa de Na^+/K^+ , así como para la ATPasa de $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ de sarcolema cardiaco puede modular la actividad, donde al parecer el efecto es directo sobre la enzima (11-13,19). También se ha sugerido la interacción directa entre el colesterol y algunas proteínas membranales del eritrocito (3). Sin embargo, el papel específico del colesterol en la estructura y función de las membranas no ha sido totalmente elucidado, a pesar de los estudios extensivos acerca de los efectos de dicho esterol en membranas modelo y membranas biológicas, por lo que continúa siendo éste un campo muy atractivo de trabajo.

Por otro lado, la importancia del colesterol en mamíferos y otros vertebrados, no radica únicamente a nivel de membrana; si no también a otros niveles del funcionamiento celular, ya que el colesterol es el precursor de moléculas de importante participación como lo son: las hormonas esteroides, los ácidos biliares, los esteroides fecales neutros, así como los mineralocorticoides y los glucocorticoides. La cantidad de colesterol metabolizado a hormonas esteroides no es muy grande, sin embargo fisiológicamente es importante, los esteroides neutros y los ácidos biliares son los principales metabolitos derivados del colesterol, los que a su vez constituyen su vía de excreción.

En el hombre y otros mamíferos, ciertas patologías se han asociado con las concentraciones alteradas de colesterol en la sangre. De esta manera, cuanto más elevado es el nivel sanguíneo de colesterol contenido en partículas denominadas lipoproteínas de baja densidad (LDL), tanto más rápido es el desarrollo de la enfermedad conocida como aterosclerosis (ver sección 2 c). Esta enfermedad, en la cual el colesterol se acumula en las paredes de las arterias y forma placas ateroscleróticas que obstruyen la luz, es la causa primaria en los infartos del miocardio, que constituye una de las causas principales de muerte en países occidentales.

En vista de que las lipoproteínas son el vehículo principal de transporte de colesterol y otros lípidos, y por la participación de estas lipoproteínas en los procesos de recambio de colesterol y fosfolípidos, los cuales se discuten en secciones posteriores; se consideró de interés el describir detalladamente su metabolismo y función.

2. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS Y SU FUNCION.

a) Clasificación y Formación de las Lipoproteínas.

Esencialmente todos los lípidos del plasma, con excepción de los ácidos grasos libres los cuales se unen a la albúmina, viajan o son transportados en complejos multimoleculares conocidos como lipoproteínas. Las lipoproteínas son partículas globulares, en su parte central se encuentran triglicéridos y ésteres de colesterol, con una cubierta externa de apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre. Con base en la proporción de sus constituyentes lipídicos y al tipo de apoproteína presente se pueden distinguir cuatro clases discretas de lipoproteínas: Quilomicrones, Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y Lipoproteínas de alta densidad (HDL) (tabla I).

TABLA I

Composición de las Lipoproteínas del Plasma Humano.

| CLASE DE LIPOPROTEINA | TRIGLICERIDOS (% DEL PESO) | FOSFOLIPIDOS (% PESO) | COLESTEROL LIBRE (% PESO) | COLESTEROL ESTERIFICADO (% PESO). | PROTEINAS (% PESO). | APOPROTEINAS PRINCIPALES |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Quilomicrones | 80-95 | 3-6 | 1-3 | 2-4 | 1-2 | A-I, A-IV, B C I, C II, E |
| VLDL | 45-65 | 15-20 | 4-8 | 16-22 | 6-10 | B, E, C I, C II C III. |
| LDL | 4-8 | 18-24 | 6-8 | 45-50 | 18-22 | B |
| HDL | 2-7 | 26-32 | 3-5 | 15-20 | 45-55 | A-I, A-II, E |

Tomada de la referencia 20.

Las vías de formación, interconversión y catabolismo de las lipoproteínas en el organismo son complejas. Los principales

ciclos metabólicos se ilustran en la figura 2.

Los quilomicrones son producidos en el hígado a partir de las grasas de la dieta y contienen principalmente triglicéridos. Los quilomicrones son secretados en la linfa, entran a la circulación sanguínea a través del ducto torácico y pasan a la circulación periférica, donde la lipoproteína lipasa (LPL), localizada en la superficie del endotelio vascular, hidroliza la mayor parte de los triglicéridos. Después de la lipólisis, los quilomicrones remanentes son tomados por el hígado, el cual produce lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales son secretadas a la circulación hepato-periférica.

En la circulación sanguínea, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son el sustrato de la lipoproteína lipasa, enzima que hidroliza los triglicéridos. Esta hidrólisis produce un aumento en la densidad de las partículas, hasta que se forman las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que pasan por un estado intermediario conocido como lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), parte de las cuales son tomadas por el hígado.

Las LDL son las principales acarreadoras de colesterol en el plasma humano y abastecen de colesterol a las células hepáticas y extrahepáticas, mediante una vía conocida como endocitosis mediada por receptores a apoproteínas B/E (sección 2 b). Las HDL sirven como aceptoras del exceso de materiales de la superficie de los quilomicrones depletados de triglicéridos y partículas VLDL. El exceso de colesterol libre es esterificado por medio de la lecitina-colesterol transferasa (LCAT) y es transferido a las lipoproteínas de baja densidad por medio de la acción de proteínas del plasma (ver sección 4).

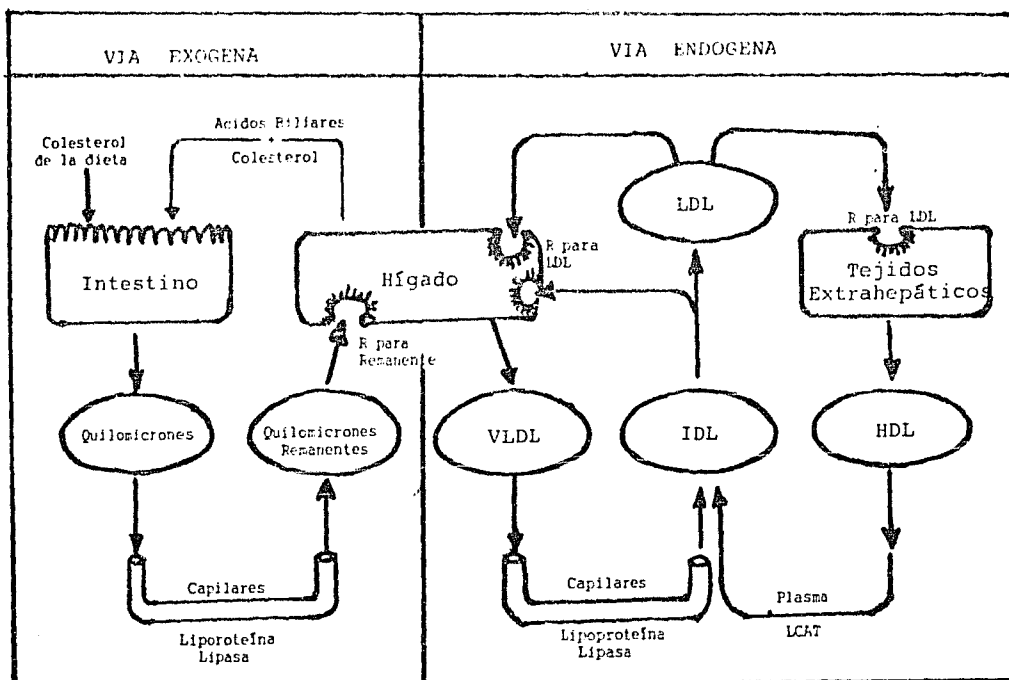


Figura 2. Vías de formación y catabolismo de las lipoproteínas. R, receptor; LDL, lipoproteína de baja densidad; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; HDL, lipoproteína de alta densidad; LCAT, lecitina colesterol aciltransferasa (tomado de la referencia 20).

Por otro lado, se ha encontrado que las HDL son aparentemente las lipoproteínas responsables del transporte reverso de moléculas de colesterol provenientes de varios tejidos, para ser llevadas al hígado (21 y sección 3 h).

El colesterol que retorna al hígado puede ser secretado en la bilis como ácidos biliares, y una fracción de éstos se pierden en las heces.

b) Endocitosis Mediada por Receptores y Catabolismo de las LDL.

El fenómeno de endocitosis mediada por receptores, fue identificado por primera vez en los estudios acerca de los receptores para LDL (22). Subsecuentemente se ha demostrado que este mismo fenómeno se aplica a una gran variedad de moléculas como son: el factor de crecimiento epidermoide, la insulina, la transferrina, algunas toxinas, etc. (23).

En su forma funcional el receptor para las LDL es una glicoproteína transmembranal con un peso molecular aparente de 160 kDa (24). Inicialmente se sintetiza un precursor con un peso molecular aparente de 120 kDa. Después de la síntesis, el precursor de 120 kDa es convertido a la forma madura de 160 kDa por la adición de residuos de carbohidratos (23,25), la cantidad de carbohidratos que se adiciona no es suficiente para provocar un incremento real de 40 kDa en el peso molecular, pero muy probablemente provoca una serie de cambios conformacionales, los que a su vez producen una migración anormal en los geles de poli-acrilamida con SDS (25).

Aproximadamente 45 minutos después de su síntesis, el receptor para la LDL aparece en la superficie de la célula, donde es agrupado junto con otros receptores en regiones de la membrana plasmática llamados hoyos o pozos cubiertos (coated pits) (26,27). Estos pozos son recubiertos en su parte citoplásmica por una proteína llamada clatrina, la cual está conectada al citoesqueleto. Los receptores localizados en dichos pozos reconocen a las LDL y se unen a ellas mediante la apoproteína B. El receptor también interactúa con la apoproteína E, por lo que al receptor para LDL, también se le ha llamado receptor apo-B,E (21).

De 3 a 5 minutos después de su formación, los pozos cubiertos se invaginan y forman vesículas endocitóticas cubiertas, y rápidamente la clatrina se disocia de la superficie de las vesículas cubiertas que pasan a ser vesículas con una superficie lisa (figura 3). Varias vesículas de éstas, se fusionan para formar estructuras llamadas endosomas (28). Se ha encontrado que el pH de los endosomas es más bajo que el del citoplasma que lo rodea, debido a la presencia de bombas de protones en la membrana del endosoma que acidifica su contenido (23).

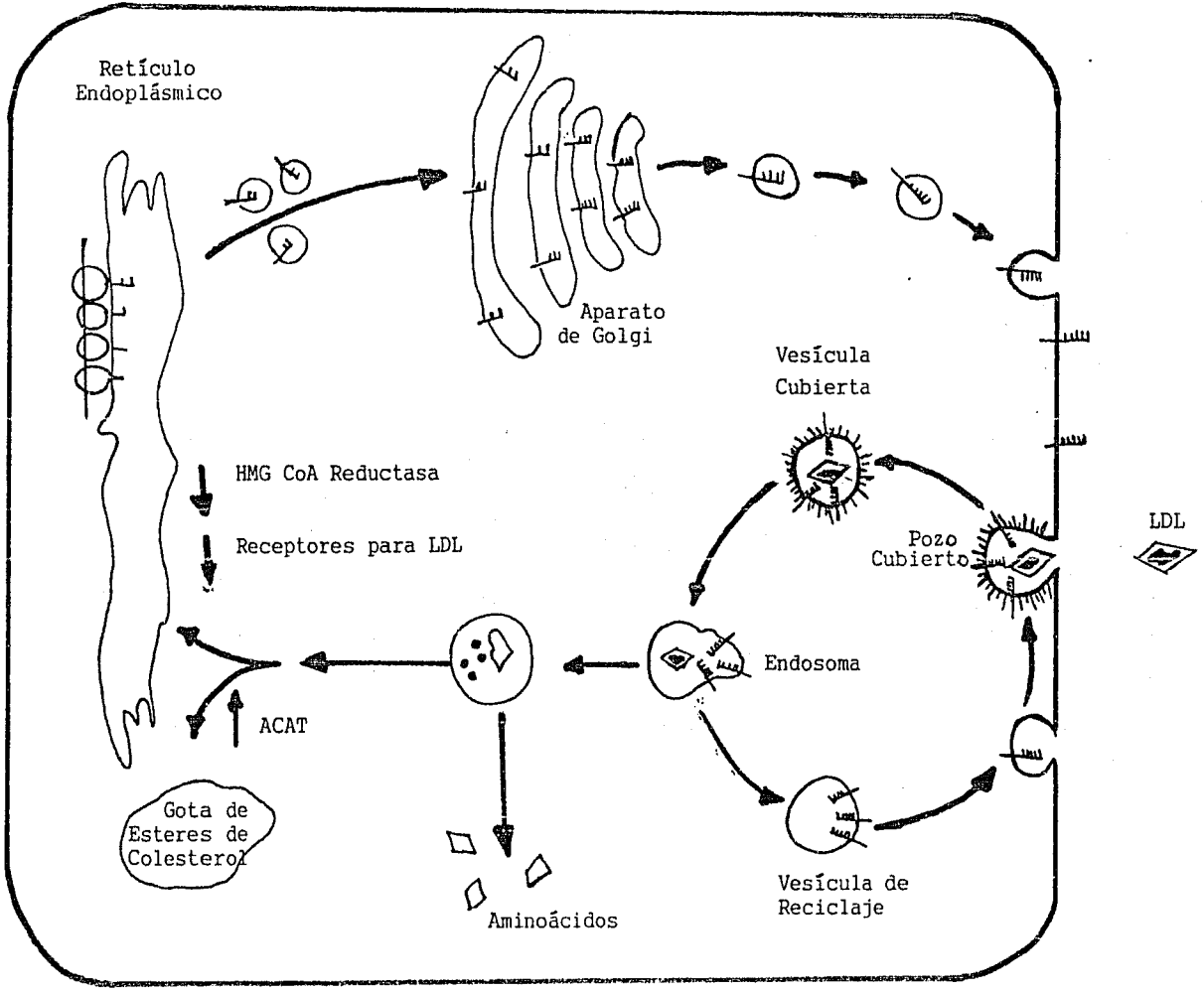


Figura 3. Endocitosis mediada por receptores. HMG-CoA reductasa denota la 3-hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A reductasa; ACAT denota la acil-CoA:colesterol aciltransferasa; LDL, lipoproteína de baja densidad. Las flechas verticales indican efectos regulatorios (tomado de la referencia 23).

Bajo la influencia de un pH ácido, las LDL se disocian de sus receptores, y entonces éstos pueden regresar a la superficie (figura 3), aparentemente se agrupan con otros receptores en un segmento de la membrana del endosoma que se constriñe para formar una vesícula de reciclaje que regresa receptores a la superficie celular (23). Una vez que la vesícula de reciclaje alcanza la superficie, el receptor se puede unir a otra partícula LDL, e iniciar otro ciclo de endocitosis y reciclaje. Cada receptor hace un viaje completo cada 10 minutos de manera continua (23).

Las LDL que se disocian del receptor, permanecen en el endosoma, el cual se fusiona a un lisosoma en donde las LDL son expuestas a una variedad de hidrolasas ácidas (figura 3). Sus componentes proteicos son hidrolizados por proteasas, produciendo aminoácidos. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por una lipasa ácida que libera colesterol y ácidos grasos (26). Cuando el colesterol se ha acumulado en el citoplasma, éste media tres reacciones de regulación por retroinhibición, lo que permite mantener un nivel constante de colesterol dentro de la célula (26). 1) bloqueo de la síntesis intracelular de colesterol por la supresión de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa; 2) activación de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT), la cual le une un ácido graso para que el exceso de colesterol pueda ser almacenado en gotas citoplásmicas, como ésteres de colesterol; 3) Probablemente el efecto más importante la supresión de la síntesis de receptores para LDL, constituye el tercer punto de regulación (23,26). A través de este mecanismo de retroinhibición, las células ajustan el número de receptores de tal manera

que solo aporten el colesterol necesario para su crecimiento. Cuando las células están creciendo activamente y requieren grandes cantidades de colesterol para la síntesis de nuevas membranas plasmáticas, sintetizan un gran número de receptores para LDL y toman el colesterol contenido en estas partículas (26). Cuando las células en cultivo llegan a la confluencia, éstas pueden suprimir la producción de receptores para LDL en un 90%, lo que las protege de una sobreacumulación de colesterol cuando sus necesidades por este esterol disminuyen (23,26).

c) Defectos Genéticos en los Receptores para LDL y Aterosclerosis

Desde 1913 Anitsckow, demostró que un nivel alto de colesterol en conejos puede producir aterosclerosis. Estudios en animales han demostrado que cuando se elevan los niveles de colesterol en el plasma por ingestión de colesterol se tiene como resultado la aterosclerosis. Datos epidemiológicos sostienen una relación entre niveles elevados de LDL en el plasma y la incidencia de enfermedades cardíacas de las coronarias en la población humana (20).

El papel de los niveles altos de LDL y de sus receptores en la génesis de la aterosclerosis se ha establecido por la disponibilidad de fibroblastos en cultivo de pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF), un desorden genético, cuyos individuos no pueden producir receptores funcionales para LDL. Esta enfermedad es heredada como un padecimiento autosomal dominante (20,23,26). La forma homocigótica en la cual dos genes anormales son heredados es sumamente rara, aproximadamente un caso en un

millón de personas. En estos pacientes el colesterol sanguíneo puede alcanzar 1 g/día, 6 a 10 veces el nivel normal. La aterosclerosis en las coronarias se desarrolla antes de los 20 años, siendo letal. Los heterocigotos para esta enfermedad son relativamente comunes, aproximadamente uno en 200 a 500 personas. Estos individuos tienen niveles de LDL 2 a 4 veces por arriba del normal y desarrolla aterosclerosis severa entre la 3ª y 5ª década de vida (23,26). En ambos casos la elevación de los niveles de LDL en el plasma se debe a la remoción reducida de las LDL, debido a la ausencia de receptores funcionales para estas partículas en las células del organismo.

Los estudios de incorporación de [³⁵S]metionina en receptores inmunoprecipitables, han revelado que las mutaciones en el gene del receptor de pacientes con HF, caen en por lo menos cinco clases (29,30). El alelo mutante más común en el locus del receptor para LDL, no codifica la síntesis de alguna molécula de receptor inmunoprecipitable. Una segunda clase de alelos mutantes, produce receptores que son sintetizados, procesados y llevados normalmente a la superficie celular. Una vez en la superficie, estos receptores se unen a anticuerpos mono y policlonales dirigidos contra receptores de personas normales; sin embargo dichos receptores defectuosos son incapaces de unirse a las LDL. Una tercera clase de mutaciones, codifica para receptores que son sintetizados como precursores de 120 kDa que aparentemente son normales, pero que no son debidamente procesados en cuanto a los carbohidratos, por lo que no alcanzan la superficie celular (25,29,30). Una cuarta clase de mutación, está dada por la síntesis de precursores anormales de 100, 135 y 170 kDa, en contras-

te con el precursor normal de 120 kDa (29,30). Algunos de estos precursores anormales pueden ser procesados y transportados hasta la superficie celular, pero son incapaces de unirse a las LDL (23). Una quinta clase de mutaciones incluye varios alelos mutantes, en los cuales los receptores anormales son llevados a la superficie, donde se unen a las LDL con una afinidad normal, pero son incapaces de migrar a las pozas cubiertas (23). Por lo que estos receptores no pueden llevar LDL al interior de la célula.

Con base en estos estudios llevados a cabo en pacientes con HF (29,30), se ha demostrado que las mutaciones antes mencionadas, se dan en el locus del receptor para LDL, y no en proteínas necesarias para modificar o transportar el receptor a la superficie celular. La elucidación del papel de los receptores para LDL, fue también facilitada por la disponibilidad de conejos con hipercolesterolemia y aterosclerosis espontánea, descrita primeramente por Watanabe y cols. (31).

Por otro lado se ha demostrado que en macrófagos, existen dos tipos diferentes de receptores: 1) receptores para LDL acetiladas, y 2) receptores para β -VLDL. Se sugiere que estos receptores juegan un papel en la conversión de estas células en células espumosas (foam cells), ya que por estos dos tipos de receptores los macrófagos son capaces de internalizar un exceso de colesterol, el cual se acumula en el citoplasma en forma de gotas de ésteres de colesterol (21,32-34). Estas gotas dan al citoplasma una apariencia espumosa al ser vistas en el microscopio electrónico.

Sin embargo, la aterosclerosis no solamente se desarrolla

por la falta de receptores funcionales para LDL o por la presencia de lipoproteínas modificadas, sino también, se puede dar por la síntesis de apoproteínas defectuosas, principalmente apo-B, las cuales no pueden ser reconocidas por sus receptores, por lo tanto no pueden ser transportadas al interior de la célula; y por consiguiente su nivel en el plasma se eleva. También se ha descrito una enfermedad conocida como síndrome de Wolman, cuyos pacientes carecen de la lipasa ácida lisosomal, enzima que normalmente hidroliza los ésteres de colesterol y triglicéridos. Debido a esto, los ésteres de colesterol provenientes de las LDL se acumulan en los lisosomas. Esta acumulación es particularmente marcada en las arterias, dando como consecuencia la formación de ateromas (26).

De la misma manera, se podrían mencionar otros padecimientos relacionados con el metabolismo del colesterol y lipoproteínas que conllevan a la hipercolesterolemia y aterosclerosis. Sin embargo, están fuera de los objetivos de la presente tesis.

A pesar de conocerse el papel de los receptores para LDL en la génesis de la aterosclerosis, el mecanismo molecular por el cual las LDL y otras lipoproteínas son aterogénicas, aún no ha sido elucidado. Sin embargo se han propuesto dos posibilidades:

- 1) los niveles elevados de LDL en el plasma sanguíneo pueden dañar a las células endoteliales (20) por lo tanto, las células del músculo liso pueden estar directamente expuestas a las LDL y otros constituyentes de la sangre como las plaquetas. Estas últimas al agregarse provocan la liberación de un factor de crecimiento, el cual puede estimular a las células del músculo liso a proliferar y secretar una matriz de elementos de tejido

conectivo; lo que a su vez puede provocar el inicio de una placa aterosclerótica. 2) un segundo mecanismo propone que ciertas subclases de lipoproteínas como lo son las acetil-LDL y β -VLDL, pueden ser consideradas específicamente aterogénicas; debido a que los macrófagos no las pueden metabolizar, se acumulan en su citoplasma, por lo que se convierten en células espumosas, las cuales se han asociado con los ateromas (21,32-34).

Existen evidencias firmes que sostienen que la disminución de las LDL del plasma puede reducir el riesgo de enfermedades cardíacas de las coronarias en pacientes hipercolesterolémicos. Por otro lado, se ha demostrado que los niveles bajos de HDL en el plasma están también asociados con enfermedades prematuras de las arterias coronarias. Los niveles reducidos de HDL y la apolipoproteína A-I presumiblemente llevan a un transporte reverso ineficiente del colesterol, ya que la HDL es aparentemente el acarreador primario en esta vía (ver sección 3 h).

3. TRANSFERENCIA Y RECAMBIO DE COLESTEROL LIBRE Y FOSFOLIPIDOS

a) Consideraciones Generales y Mecanismos.

Gran parte del colesterol ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptores (sección 2 b). Sin embargo, la transferencia de colesterol libre (no esterificado), la cual no es mediada por receptores, se supone que es fisiológicamente significativa (35).

El recambio espontáneo de colesterol entre el plasma y eritrocitos, fue reportado por primera vez por Hagerman y Gould (36), desde entonces se ha demostrado que ocurre en una gran variedad de membranas biológicas, lipoproteínas y liposomas. Aunque el recambio de colesterol está bien documentado, el mecanismo para este proceso aún no está bien establecido. Al respecto se han propuesto dos posibilidades: La primera propuesta inicialmente por Hagerman y Gould (36), y posteriormente discutida por otros investigadores, llamada transferencia o recambio de colesterol libre por difusión a través de una fase acuosa (ver figura 4a). Este mecanismo propone que el colesterol o fosfolípidos son extraídos de la vesícula o partícula donadora y quedan "solubles" en la fase acuosa, en la que difunden hasta alcanzar la partícula aceptora; se ha mencionado como limitante del proceso la velocidad de liberación del lípido de la partícula donadora. Un segundo mecanismo propuesto primeramente por Gurd (36) sugiere, que el recambio de colesterol entre las membranas tiene lugar después de un contacto de éstas membranas como un resultado de la colisión (ver figura 4b y 4c). Esta última propuesta que también se aplica al recambio de fosfolípidos, está

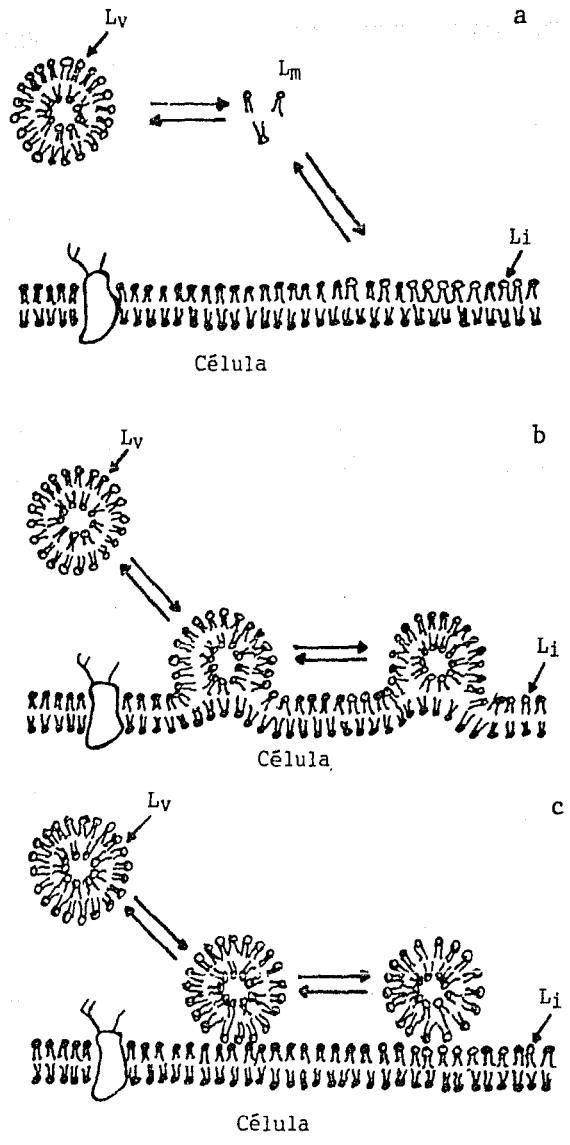


Figura 4. Representación de los mecanismos de transferencia y recambio de lípidos. a) transferencia o recambio de lípidos por difusión del monómero a través de una fase acuosa; (b y c) transferencia y recambio de lípidos por complejos de colisión. L_v , lípido en la vesícula; L_i , lípido incorporado; L_m , lípido monomérico (tomado de la referencia 35).

basada solamente en la observación de que el colesterol y los fosfolípidos son esencialmente insolubles en agua. Sin embargo este mecanismo no puede explicar cómo el colesterol y los fosfolípidos se transfieren a velocidades diferentes.

Actualmente no hay un acuerdo general entre cual de los dos mecanismos es el que opera en la transferencia de colesterol y otros fosfolípidos, porque existen evidencias que sostienen ambas posibilidades (35,36).

b) Transferencia y Recambio de Colesterol y otros Lípidos entre Liposomas.

Los liposomas han sido de gran utilidad para tratar de elucidar los mecanismos de transferencia y recambio de lípidos, básicamente porque se pueden formar liposomas donadores y aceptores bien definidos, en cuanto a su composición, tamaño, carga, etc. Bajo condiciones apropiadas, estos liposomas son estables y permiten una experimentación e interpretación menos complicada de los datos cinéticos.

Como lo discuten McLean y Phillips (37), la cinética de recambio o transferencia de colesterol en vesículas unilamelares pequeñas tiene las siguientes características: 1) La velocidad de recambio de colesterol es de primer orden con respecto a la concentración de colesterol libre en la partícula donadora; 2) Se transfieren aproximadamente 6 moléculas de colesterol por cada molécula de fosfatidilcolina, debido a que el primero es más soluble en agua (3×10^{-3} M y 4.6×10^{-10} M) respectivamente; 3) El proceso de recambio es dependiente de la temperatura, se ha determinado experimentalmente una energía de activación (ΔG°) de

73 ± 5 kJ/mol; 4) y por último, al utilizar una relación alta de liposomas aceptores/donadores, se ha observado que la velocidad de recambio es de orden cero con respecto a la concentración de liposomas receptores (37). Con base en estudios de filtración en gel y estudios de microscopía electrónica, se ha demostrado que durante el proceso de recambio de colesterol no ocurre fusión de liposomas (37).

Experimentos recientes donde los liposomas donadores y receptores fueron separados por una membrana de diálisis, han demostrado que cierto porcentaje de colesterol marcado radiactivamente puede difundir a través de la membrana (36-38). En estos trabajos también se menciona, que la difusión de los lípidos se puede incrementar por la adición de etanol (37), acetona o dimetil sulfóxido (38), los que aumentan la solubilidad del colesterol en fase acuosa, y con ello su transferencia. Estos resultados y las cuatro características antes mencionadas, así como los estudios de resonancia magnética nuclear (39), han demostrado que no ocurre fusión entre las vesículas durante la transferencia de colesterol, y son consistentes con un mecanismo que involucra la difusión de moléculas de colesterol en fase acuosa.

Al emplear liposomas de fosfolípidos y colesterol, se ha encontrado una relación inversa entre la velocidad de recambio y la longitud de la cadena hidrocarbonada (40). La velocidad de recambio de un lípido ácido puede también ser sensible a la concentración de iones calcio, concentraciones apropiadas de iones calcio y fosfato reducen la velocidad de transferencia de la fosfatidilserina en 10 veces; mientras que, la velocidad de

transferencia para la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, PN-succiniletanolamina y ácido fosfatídico no se ve afectada (41). La unión de moléculas de ácidos biliares a la superficie de las vesículas puede aumentar la liberación de la fosfatidilcolina por arriba de cinco veces, debido a que disminuye su ΔG° de liberación (42).

Diferentes esteroides se recambian a diferentes velocidades y las constantes de velocidad de liberación, para algunos de los esteroides más polares son mayores que para el colesterol. Sin embargo, algunos esteroides menos polares se recambian más rápidamente que el colesterol, lo cual probablemente se debe a interacciones menos fuertes con los fosfolípidos en la vesícula donadora (43).

El tipo de fosfolípido empleado para hacer la vesícula donadora, puede modificar el tiempo medio de recambio del colesterol. Bittman y cols. (44), han demostrado, que el tiempo de liberación del colesterol de vesículas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol son similares; mientras que la incorporación de esfingomielina a la vesícula donadora, reduce significativamente la velocidad de recambio de colesterol (44,45). Esto implica, que la energía de las interacciones intermoleculares colesterol-esfingomielina son mayores que la del colesterol con otros fosfolípidos.

Una variable adicional que puede influir en las interacciones moleculares en la superficie de una vesícula de fosfolípidos, es el tamaño de la partícula. Por ejemplo, la velocidad de recambio del colesterol de liposomas unilamelares de 230 Å de diámetro es aproximadamente 5 veces mayor que para liposomas unilamelares con

la misma composición, pero con un diámetro de 800 Å (46). El tamaño de los liposomas receptores, no afecta el recambio del colesterol libre (46).

En resumen se puede decir, que los estudios de recambio de colesterol libre con liposomas han aportado evidencias de la manera en la que las interacciones entre los lípidos modulan la velocidad de liberación y recambio del colesterol.

c) Transferencia y Recambio de Colesterol entre Lipoproteínas.

Estudios de resonancia magnética nuclear, han establecido que tanto en liposomas, como en las HDL y LDL de humano, la localización y movimiento de moléculas de colesterol libre son similares (47-49). Esencialmente todas las moléculas de colesterol libre en los liposomas unilamelares, así como en las HDL y LDL humanas están en una poza de recambio. En trabajos similares, se ha encontrado que más del 90 % del [¹⁴C]colesterol libre incorporado en las HDL se trasfiere a las LDL, en un proceso de primer orden, cuyo tiempo medio es 2.9 min a 37°C (50). El tiempo medio de transferencia de colesterol para otras lipoproteínas se muestran en el trabajo realizado por Phillips y cols. (35).

El recambio de colesterol libre entre lipoproteínas, es de primer orden con respecto a la concentración de colesterol libre en la lipoproteína donadora y altamente dependiente de la temperatura (35). Otros trabajos han establecido que el recambio de colesterol de las HDL es independiente de la concentración de LDL, y que el recambio de fosfatidilcolina es más lento que el recambio del colesterol libre de las HDL (50). En vista de que los cuatro criterios mencionados en la sección 4 b, se aplican al

sistema HDL-LDL, es razonable suponer, que el mecanismo de recambio de colesterol involucra la liberación de moléculas de colesterol de la lipoproteína donadora y su difusión a través de la fase acuosa.

La composición de fosfolípidos de la lipoproteína donadora, puede afectar la velocidad de recambio del colesterol. Al incrementar la insaturación de los fosfolípidos, se favorece el flujo de colesterol, mientras que al incrementar la concentración de esfingomielina, esta velocidad de recambio disminuye (35). Adicionalmente se ha encontrado que la superficie de las LDL de humano es rica en fosfatidilcolina y esfingomielina, comparada con las HDL, por lo que el flujo de colesterol más bajo observado en las LDL se puede deber a la mayor cohesión entre el colesterol y los fosfolípidos de la superficie, lo que aumentaría la energía requerida para la liberación del colesterol (35).

En vista de disponer de pocos datos en relación al recambio de colesterol en otras lipoproteínas, se ha dificultado proponer un mecanismo general de recambio de colesterol y lípidos en lipoproteínas ricas en triglicéridos.

d) Transferencia y Recambio de Colesterol en Eritrocitos.

El eritrocito ha sido ampliamente utilizado para realizar estudios de transferencia y recambio de lípidos, debido a que es un sistema bastante conocido, cuyas membranas, que carecen de receptores para lipoproteínas son fáciles de aislar. Por otro lado los datos obtenidos en estos estudios, pueden tener un significado fisiológico directo.

Los primeros en establecer la naturaleza fisicoquímica del

proceso de recambio de colesterol en eritrocitos, así como el tiempo medio requerido para la transferencia de colesterol fueron Hagerman y Gould en 1951 y Murphy en 1962 (35,51), desde entonces se han realizado un gran número de trabajos para tratar de elucidar los mecanismos de transferencia y recambio de colesterol en esta célula.

Bojesen (52) concluye que el mecanismo de difusión acuosa describe adecuadamente el recambio de colesterol libre entre eritrocitos y lipoproteínas, y que durante el proceso de recambio no ocurre un contacto directo entre los dos tipos de partículas. Lange y cols. (53), han descrito la cinética de recambio de colesterol entre eritrocitos de humanos y lipoproteínas, en términos de un modelo de tres compartimientos, que incluye el colesterol disuelto en el compartimiento acuoso. Este último grupo concluye que el modelo de transferencia de colesterol a través de una fase acuosa, satisface sus datos experimentales. Además, se ha demostrado que el mecanismo de recambio de colesterol libre no involucra la unión de lipoproteínas a sitios específicos en la superficie del eritrocito (53).

Aunado a los datos antes mencionados, los cuatro criterios mencionados (sección 3 b) se satisfacen para la transferencia de colesterol en los eritrocitos. El recambio de colesterol libre en estas células es de primer orden respecto a la concentración de colesterol en el eritrocito donador (35), y es dependiente de la temperatura. Se han reportado energías de activación medidas experimentalmente de 50 a 80 kJ/mol (54). La velocidad de recambio de la fosfatidilcolina es más lenta que la del colesterol (35), y la de éste último, es de orden cero con

respecto a la concentración de partículas aceptoras (52-54). Todos estos datos son consistentes con el mecanismo de transferencia y recambio de colesterol por difusión en fase acuosa.

e) Transferencia y Recambio de Colesterol en Células Procariontes.

Las ventajas de un sistema como los micoplasmas, es que estas células no pueden sintetizar colesterol, pero requieren esteroides para crecer. Las células intactas o membranas aisladas, pueden fácilmente incorporar moléculas de colesterol. Estas células intactas no pueden pinocitar partículas, por lo que el movimiento de colesterol libre hacia las células, ocurre solamente por un proceso de transferencia superficial. Bittman y sus colegas, han estudiado la cinética de transferencia de colesterol libre y fosfolípidos marcados radiactivamente, de células de Mycoplasma gallisepticum a liposomas (55-57). La cinética del proceso es consistente con el recambio de colesterol por difusión a través de una fase acuosa. El recambio de colesterol ocurre cuando las células donadoras y los liposomas aceptores son separadas por una membrana de diálisis. Se ha observado que la velocidad de recambio se incrementa cuando se adiciona dimetil sulfóxido y tiocianato de potasio, los cuales aumentan la solubilidad del colesterol en fase acuosa (35).

El colesterol puede transferirse de liposomas de colesterol libre/fosfolípidos o lipoproteínas del suero en el medio extracelular, a las membranas de los micoplasmas. La transferencia de colesterol libre de las HDL ó LDL de humano a la membrana del micoplasma se da sin la entrada de la lipoproteína (58), y para

el caso de las LDL no se requiere su unión a la membrana. Las LDL son donadores más efectivos de colesterol libre que las HDL, debido posiblemente a su relación relativamente alta de colesterol/fosfolípido (35).

f) Transferencia y Recambio de Colesterol en Monocapas Celulares en Cultivo.

Después de haber discutido acerca de la transferencia y recambio de colesterol en células que no lo sintetizan, en esta sección se tocará lo referente al recambio de colesterol en células que pueden sintetizar colesterol y ésteres de colesterol, lo cual complica aún más la interpretación de los datos, porque hay que considerar la síntesis endógena y la distribución celular de colesterol.

En condiciones de cultivo se ha observado que existe un flujo bidireccional de colesterol, el cual permite el recambio y la transferencia del colesterol sin gasto de energía metabólica entre las células y el medio de cultivo que puede contener: plasma sanguíneo, suero o lipoproteínas aisladas; al respecto se han reportado varias constantes y datos cinéticos (35). Sin embargo, en condiciones adecuadas de cultivo, se puede lograr un eflujo neto de colesterol de las células, condición que permite estudiar el flujo unidireccional, relativamente más simple que el flujo bidireccional de colesterol libre. Esta condición se logra al adicionar al medio un aceptor, generalmente en exceso, que no contiene colesterol libre.

Las investigaciones realizadas por Stein y cols. (59), en las que se emplearon diferentes complejos de fosfolípidos/apoli-

poproteínas para remover el colesterol de varias líneas celulares demuestran, que las apolipoproteínas per se son pobres aceptoras del colesterol libre celular, pero después de acomplejarlas con varios fosfolípidos se logra un eflujo eficiente de colesterol. Al incrementar la concentración de fosfolípidos aumenta el eflujo.

Como se mencionó anteriormente es importante considerar la distribución del colesterol celular, y al respecto algunos autores han propuesto que en la célula hay dos pozas de colesterol libre que se recambian a diferente velocidad; se considera que hay una poza de recambio rápido, localizada en la membrana plasmática y que constituye el mayor porcentaje (70 a 95 %) del colesterol libre celular (60), y una poza de recambio lento, localizada en las membranas internas (35). Por otro lado y de manera interesante se ha encontrado que el colesterol libre transferido a la membrana plasmática por medio de vesículas donadoras, puede provocar una regulación negativa de la síntesis de colesterol libre, disminuye la entrada de las LDL e incrementa la esterificación del colesterol libre citoplásmico (61,62).

Los estudios encaminados a determinar la cinética de recambio de colesterol libre entre células en cultivo y varios aceptores en el medio extracelular, han determinado que el eflujo de colesterol es de primer orden con respecto a la concentración de colesterol libre en las células donadoras (35), se ha calculado una energía de activación de aproximadamente 50 kJ/mol para dicho proceso (35). El recambio es prácticamente de orden cero con respecto a la concentración de las vesículas aceptoras, aunque para ello se requieren relaciones significativamente altas

de aceptor/donador (63,64). Estos datos son muy similares a los obtenidos para el caso de los liposomas (sección 3 b), por lo que se puede suponer que el recambio de colesterol libre entre células y partículasceptoras, involucra la liberación de moléculas de colesterol libre de la membrana plasmática y la difusión de éstas a través de una fase acuosa, hasta que son absorbidas por una partícula aceptoras.

Se han reportado (35,65) algunos parámetros cinéticos del eflujo de colesterol en varias líneas celulares. De manera interesante se encontró que existen diferencias cinéticas en la transferencia de colesterol libre en los diferentes tipos celulares. Estas diferencias pueden estar dadas por variaciones en parámetros tales como: 1) contenido de colesterol libre; 2) grado de insaturación de fosfolípidos; 3) relación fosfatidilcolina/esfingomielina; y 4) la interacción del colesterol con las proteínas de la membrana.

g) Aporte de Colesterol de las HDL a Células Esteroidogénicas.

Existen varias evidencias que permiten decir que las HDL están involucradas en el aporte de colesterol a células esteroi-
dogénicas. Cuando son estimuladas las glándulas adrenales o células de la corteza adrenal con la hormona adrenocorticotrófica, éstas utilizan eficientemente el colesterol de las HDL, aumentándose la captura de colesterol libre y de análogos de ésteres de colesterol, como una respuesta al estímulo (66-68). Las glándulas adrenales en ratas intactas y células de la corteza adrenal en cultivo toman el colesterol y análogos de ésteres de colesterol de las HDL, mucho más rápido que la entrada de las

apolipo-proteínas a la células (66-68).

De la misma manera, las células de ovario de rata estimuladas con hormona adrenocorticotrófica utilizan eficientemente el colesterol asociado a las HDL para la producción de esteroides (69,70). Experimentos en los que se han utilizado células de la granulosa de rata en cultivo y HDL artificiales reconstituidas con [^{14}C]colesterol y [^3H]ésteres de colesterol, indican que la incorporación de colesterol libre proveniente de las HDL en las hormonas esteroides es cuatro veces mayor que la incorporación de colesterol esterificado de las HDL (35). Estos resultados sugieren que la transferencia superficial de colesterol de las HDL es cuantitativamente importante para la esteroidogénesis en células de ovario y en células adrenales.

Al parecer el aporte de colesterol para la esteroidogénesis procede independientemente de la pegada específica de la HDL a la superficie celular, ya que el tratamiento de las HDL con tetra-nitrometano, un reactivo que bloquea la pegada específica de las HDL a las superficies celulares, no tiene ningún efecto en la esteroidogénesis dependiente de HDL en células de ovario y de la granulosa (71).

h) Remoción del Colesterol de los Tejidos y su Transporte Reverso al Hígado.

El concepto de transporte reverso de colesterol, para designar el movimiento de colesterol de los tejidos al hígado mediado por las HDL, ha recibido una gran atención en los últimos años, debido a que se ha demostrado una correlación negativa entre los niveles de HDL en el plasma y el desarrollo de la aterosclerosis.

Evidencias más concretas para el transporte reverso del colesterol provienen de una variedad de experimentos en los que se han empleado células en cultivo, los cuales han demostrado la capacidad que tienen los complejos de apolipoproteínas/fosfolípidos o de las HDL para estimular el eflujo de colesterol libre de las células (sección III. f). En acuerdo con estos estudios, la regresión de lesiones ateroscleróticas en animales modelo, sugieren la existencia de un sistema de transporte de colesterol para remover el colesterol depositado en las paredes de las arterias (35). Sin embargo, no se ha obtenido una demostración clara de la vía de transporte reverso de colesterol en estudios con animales completos, debido a las dificultades que ello representa.

Actualmente existe una gran controversia entorno al mecanismo por el cual las HDL remueven el colesterol de las células. Hay quienes sostienen que la pegada de las HDL a la célula promueve la remoción de colesterol (72,73), mientras que otros autores reportan que el eflujo y remoción de colesterol de las células no requiere de la unión de las HDL a la célula (71,74).

En las células extrahepáticas, el transporte reverso de colesterol se inicia con la transferencia del colesterol libre de las membranas celulares a las HDL (75). Esta transferencia probablemente es facilitada por la esterificación del colesterol en la HDL por la lecitina:colesterol acil transferasa, enzima que al parecer genera un gradiente continuo de colesterol libre necesario para mantener un movimiento neto de colesterol de las células a las lipoproteínas aceptoras (76,77).

Existen pocos datos de cómo el colesterol destinado para la

excreción es llevado al hígado, y parece que están involucrados varios procesos como: 1) la transferencia de colesterol libre de las HDL al hígado (78,79); 2) la transferencia de ésteres de colesteril directamente de la HDL (67,68,80); 3) la entrada por endocitosis y degradación de las HDL (73,81); 4) el aporte por endocitosis de ésteres de colesteril a través de una lipoproteína de baja densidad como intermediario (75). Los estudios in vivo (79,82), sugieren que la transferencia del colesterol no esterificado de la HDL es el componente principal del aporte de colesterol al hígado, este aporte puede ser facilitado por la hidrólisis de fosfolípidos en las HDL, una reacción mediada por la lipasa hepática (75). Otras investigaciones in vivo han indicado que el colesterol libre proveniente de las HDL sirve como sustrato preferencial para la síntesis de ácidos biliares (83).

i) Mecanismos que Regulan la Homeostasis del Colesterol.

Con base en los antecedentes mencionados y a manera de resumen se mencionarán los mecanismos o factores que regulan la homeostasis del colesterol en las células para su funcionamiento óptimo. Las células pueden utilizar ya sea colesterol exógeno o colesterol sintetizado endogenamente. La síntesis de novo o la movilización de los almacenes de ésteres de colesterol pueden aportar el colesterol endogeno; mientras que, el colesterol exógeno proviene de las lipoproteínas que circulan en la sangre.

Las vías involucradas en el balance celular del colesterol, están resumidas en la figura 5. El aporte de colesterol a la célula, se da por medio de endocitosis mediada por receptores (sección 2 b), y por la transferencia de moléculas de coleste-

rol libre de las lipoproteínas a la membrana plasmática celular mediante un proceso de difusión en fase acuosa. El procesamiento intracelular de las LDL ha sido discutido en detalle (sección 2 b). Tanto el receptor para las LDL, como la HMG-CoA reductasa están sujetos a una regulación por retroinhibición dada por el colesterol. Como la endocitosis de las LDL provoca un aumento en los niveles intracelulares de colesterol, la síntesis de ambas proteínas se suprime; mientras que, las moléculas de colesterol libre que se acumulan activan a la acil-CoA:colesterol aciltransferasa, enzima que esterifica el exceso de colesterol. Los ésteres de colesterol que se acumulan en inclusiones citoplásmicas, son el sustrato para la colesterol éster hidrolasa. En el caso de células que no producen hormonas esteroideas o ácidos biliares, el único mecanismo para remover el exceso de colesterol, es por el eflujo de moléculas de colesterol libre de la membrana a partículas aceptoras extracelulares.

En ausencia de crecimiento celular, tanto la síntesis y metabolismo de colesterol como la distribución de colesterol libre entre las células y el medio que contiene lipoproteínas, se aproxima a un estado estacionario dado por la igualdad en el influjo y eflujo de colesterol libre.

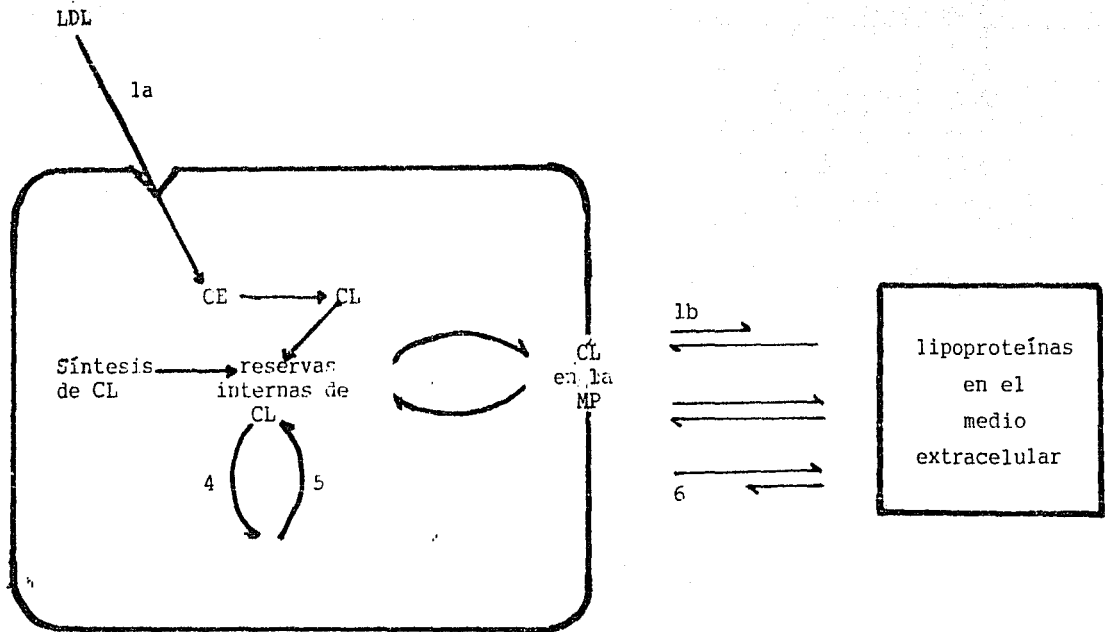


Figura 5. Metabolismo y homeostasis del colesterol celular. CE, colesterol esterificado; CL, colesterol libre; MP, membrana plasmática; LDL, lipoproteína de baja densidad (modificado de la referencia 35).

1a. endocitosis mediada por receptores; 1b. captura de colesterol libre por transferencia superficial, ésta involucra la redistribución de moléculas de colesterol entre la membrana plasmática y las lipoproteínas extracelulares, con flujo de colesterol desbalanceado, el influjo es mayor que el eflujo; paso 2. hidrólisis de los ésteres de colesterol (CE) provenientes de las LDL; paso 3. síntesis de novo de colesterol, donde la HMG-CoA reductasa es la enzima que regula la vía; paso 4. esterificación del colesterol libre (CL) por la acil-CoA:colesterol aciltransferasa, y almacenamiento de los ésteres de colesterol (CE) en inclusiones citoplásmicas; paso 5. hidrólisis de los ésteres de colesterol; paso 6. remoción neta de colesterol libre de las células, por medio de un mecanismo de transferencia superficial (éste es el reverso del paso 1b, siendo el eflujo mayor que el influjo).

4. PROTEINAS ACARREADORAS DE ESTEROLES Y OTROS LIPIDOS.

La primera evidencia de la existencia de factores solubles citoplásmicos que estimulan la conversión de escualeno a colesterol se dió al adicionar una fracción de sobrenadante de un homogenizado de hígado de rata obtenida a $105,000 \times g$, a una fracción microsomal del mismo tejido (84). Exámenes posteriores han revelado la presencia de una proteína no enzimática que se une a los precursores insolubles en agua, estimulando su velocidad de conversión a colesterol por las enzimas unidas a la membrana. Esta proteína ha sido nombrada como: proteína acarreadora de esteroides (SCP), y cuando se adiciona a una preparación microsomal inactiva de hígado de rata, restablece la actividad y la secuencia biosintética completa del escualeno al colesterol (84). Johnson y Shah (85,86), observaron en el hígado de rata una SCP sensible al calor, requerida para la conversión de escualeno a lanosterol, y una SCP termoestable que participa en la conversión de lanosterol a colesterol. Subsecuentemente Scallen y cols. (84) reconocieron dos proteínas acarreadoras de esteroides. La proteína acarreadora de esteroides 1 (SCP_1) y la proteína acarreadora de esteroides 2 (SCP_2).

La SCP_1 ha sido purificada de la fracción soluble del citoplasma de hígado de rata, y es una proteína sensible al calor. Esta proteína participa en la conversión del escualeno a lanosterol como una proteína acarreadora de manera no catalítica (87,88). Algunas de las propiedades de la SCP_1 como son: la termosensibilidad; la reacción enzimática que estimulan y el tejido de donde se aísla semejan a las del factor proteico del sobrenadante de hígado de rata descrito por Ferguson y Bloch

(89), así como a la proteína descrita por Johnson y Shah (85,86). Mientras que el factor proteico de sobrenadante requiere de fosfolípidos, para la SCP₁ la adición de fosfatidil serina es estimuladora pero no obligatoria (87).

La otra proteína acarreadora de esteroides, llamada por Scallen y cols. SCP₂, estimula la conversión de colest-5,7-dien-3 β -ol y 4,4-dimetil esteroides a colestrol, pero no estimula la ciclización del escualeno para dar lanosterol (90). La SCP₂ ha sido purificada a partir de la fracción citosólica de hígado de rata (90). Es una proteína básica (punto isoelectrico 8.6), tiene un peso molecular de 13.5 kDa determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y 15 kDa determinado por filtración en gel, es estable 5 minutos a 95°C.

Con base en la composición de aminoácidos y a las características de la SCP₂ antes mencionadas, se ha pensado que esta proteína podría corresponder a la proteína descrita por otros autores (90-93). Al realizar un estudio comparativo entre las preparaciones reportadas por grupos diferentes, se ha encontrado que la proteína SCP₂ es prácticamente idéntica a la proteína descrita por Zilversmit y cols., quienes la han llamado CM₂ (90,93).

En vista que se ha demostrado que CM₂ transfiere fosfolípidos de microsomas a mitocondrias, al igual que es capaz de transferir colestrol de microsomas a mitocondrias (94). Si la CM₂ y la SCP₂ son la misma proteína entonces, la SCP₂ puede estar involucrada no solamente en la activación de las reacciones enzimáticas microsomales que participan en la conversión de este-

roles a colesterol, sino también en la transferencia intracelular de colesterol (90). Al explorar esta hipótesis, estos mismos autores han reportado que la proteína SCP₂ transfiere colesterol de las gotas lipídicas citoplásmicas a la mitocondria en las glándulas adrenales (95), y que es capaz de estimular la producción mitocondrial de pregnenolona en el mismo tejido (96), al parecer por un mecanismo que involucra la redistribución de colesterol de la membrana interna a la membrana externa mitocondriales (97).

Recientemente, se han determinado la estructura primaria y otras propiedades de la SCP₂ (97). La SCP₂ está compuesta por una sola cadena polipeptídica con 122 residuos de aminoácidos, no contiene tirosina, arginina o histidina. Las predicciones de su estructura secundaria indican una región de α -helice para los residuos 21 a 34, y que probablemente sea el sitio de interacción con los fosfolípidos; así como una estructura β -plegada para los residuos 35 a 95. Con base en estudios inmunológicos, se ha determinado que la región comprendida entre los residuos 70 y 100 esta probablemente involucrada en la captura de colesterol. Al hacer estudios comparativos, se encontró una gran homología entre la SCP₂ de hígado de rata y la SCP₂ de hígado de bovino y con algunas inmunoglobulinas, así como con la proteína que transfiere fosfatidilcolina, pero no con la proteína que se une a ácidos grasos (97).

La SCP₂, también llamada proteína inespecífica transferidora de lípidos, no solamente ha sido purificada a partir de hígado de rata, sino también a partir de hígado de bovino (98) y de hígado de humano (99); se ha encontrado una gran similitud entre ellas.

De manera interesante se encontró que la SCP₂ está ausente en pacientes con el síndrome de Zellweger, lo cual puede contribuir a la acumulación de ésteres de colesterol, y a la síntesis deficiente de cortisol en las adrenales de dichos pacientes (99).

En adición a los estudios antes mencionados, se ha reportado una proteína que se une o pega al colesterol (CBP), aislada a partir del citosol de hígado de rata. Esta proteína aumenta la velocidad de recambio de colesterol entre microsomas y mitocondrias en dicho tejido (100). La CBP ha sido purificada, se le ha determinado un peso molecular de 26 kDa por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y 49 kDa por filtración en gel, tiene un punto isoeléctrico de 5.7 a 5.8. Los citosoles de varios tejidos extrahepáticos tales como: riñón, glándulas adrenales, testículos, corazón y otros, demostraron ser inmunoreactivos al antisuero contra CBP; por lo que se ha sugerido que esta proteína o proteínas similares pueden estar involucradas en el transporte intracelular de colesterol en los diferentes tejidos. Sin embargo, no se encontró reacción inmunoquímica con el suero total de rata, VLDL, LDL, HDL, extractos de eritrocitos o linfa intestinal. Al comparar la proteína que se une al colesterol (CBP) con las proteínas acarreadoras de esteroides (SCP), se encontró que la CBP es diferente a éstas últimas (100). Además la CBP es diferente a la proteína que se une a ácidos grasos descrita por Ockner y cols., y a la proteína recambiadora de fosfolípidos (100).

Por otro lado, se ha encontrado un grupo de proteínas especializadas conocidas como proteínas del plasma que transfieren lípidos (101). Estas proteínas facilitan el movimiento tanto de lípidos neutros (ésteres de colesterol y triglicéridos), como de

fosfolípidos entre las diferentes clases de lipoproteínas (102). Una de estas proteínas, la proteína que transfiere ésteres de colesterol (CETP), media la transferencia de ésteres de colesterol de las HDL a las LDL y VLDL; también facilita la transferencia de triglicéridos de las VLDL a las LDL y HDL (101,102). Debido a su papel en la transferencia de ésteres de colesterol, se ha pensado que la CETP puede participar en la vía de transporte reverso del colesterol. Esta proteína ha sido purificada recientemente a partir de plasma de humano (101,103), es una proteína rica en aminoácidos hidrofóbicos, especialmente leucina, tiene un peso molecular de 74 kDa y un punto isoeléctrico de 5.2.

Otras proteínas que aceleran el recambio de varios fosfolípidos entre membranas naturales y artificiales han sido aisladas de varios tejidos. Algunas de estas proteínas han sido empleadas para estudiar la distribución y migración transmembrana de fosfolípidos ácidos grasos y colesterol (94).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios realizados por Brown y Goldstein han establecido que la regulación de la homeostasis del colesterol en células de mamíferos se da principalmente a dos niveles: 1) entrada de las lipoproteínas de baja densidad por endocitosis mediada por receptores y 2) la biosíntesis de colesterol, donde la Hidroxi-metilglutaril-CoA reductasa es la enzima reguladora de la vía. Adicionalmente se ha demostrado que el colesterol puede entrar a la célula por un mecanismo de difusión en fase acuosa. Sin embargo, a pesar de ser conocido cómo el colesterol entra a la célula y cómo es metabolizado, en la actualidad es prácticamente desconocido cómo esta molécula es integrada a la membrana plasmática y a membranas internas.

Por otro lado, se han reportado proteínas solubles que se unen al colesterol y a los precursores del colesterol en el citoplasma de hígado de rata, y al parecer en otros tejidos. Así también se ha reportado la existencia de proteínas capaces de transferir ésteres de colesterol entre las diferentes lipoproteínas del plasma de humano. También se han descrito proteínas que aceleran el recambio de fosfolípidos entre membranas naturales y membranas artificiales, en la actualidad no existen reportes de proteínas específicas que aceleren el recambio de colesterol libre entre las lipoproteínas, o entre membranas naturales y/o membranas artificiales.

Desde hace algunos años en el laboratorio ha existido el interés por conocer los mecanismos de regulación del colesterol en la membrana plasmática de la célula muscular cardíaca. De

manera interesante, se ha llegado a dilucidar un importante papel de este esteroles sobre la bomba de calcio de estas membranas (12,13). En específico, al encontrarse el colesterol en concentraciones elevadas en la membrana plasmática, se ha observado una importante inhibición en la actividad de la ATPasa de (Ca^{2+}, Mg^{2+}) . En contraste la depleción de este lípido de las membranas produce un aumento en la actividad de dicha enzima. Estos cambios en la actividad de la ATPasa llevados a cabo por colesterol pudieran suponer la existencia de mecanismos de regulación de la concentración de colesterol en la sarcolema de músculo cardíaco (12,13). Estos estudios nos han permitido iniciar la búsqueda de una molécula con importante participación en la modulación de la concentración de colesterol en la membrana plasmática de la célula muscular cardíaca.

El objetivo de la presente tesis consistió en investigar la posible existencia de moléculas intrínsecas de la membrana plasmática de la célula muscular cardíaca, con afinidad por el colesterol, capaces de transferir y facilitar el recambio de este lípido entre el medio y la membrana plasmática.

III. MATERIALES Y METODOS.

1. Químicos.

Tris, Acido Etilendiaminotetraacético (EDTA), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Triton X-100, resina de colesteril hemisuccinato-agarosa, colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amonio, N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED), ditioneitol (DTT), albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, estándares de peso molecular, reactivo de Folin-fenol, dimetil sulfóxido y la sacarosa se obtuvieron de Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo, USA). El [7-³H]colesterol (actividad específica 12 Ci/mmol), se obtuvo de ICN Radiochemicals (Irvine, CA, USA). El glutaraldehído y el nitrato de plata se obtuvieron de Merck (México). Todos los otros químicos empleados en este trabajo fueron de un alto grado de pureza.

2. Aislamiento de la fracción de sarcolema cardíaco.

El aislamiento de sarcolema cardíaco se hizo de acuerdo al método de St. Louis y Sulakhe (104), modificado en nuestro laboratorio (105), el cual se describe a continuación:

Se emplearon corazones de conejos White Nueva Zelanda (machos adultos), sacrificados por dislocación cervical. Los corazones fueron removidos, y entre 12 y 15 gramos de tejido ventricular previamente limpiados de tejido conectivo, fueron seccionados con un bisturi hasta obtener pedazos pequeños, los que se resuspendieron en 8 a 10 volúmenes de amortiguador de Tris 10 mM y ditioneitol (DTT) 2 mM, ajustado con HCl a pH 7.4 y 4°C

(solución 1). La suspensión fue homogenizada a 4°C, utilizando tres exposiciones de tres segundos cada una en un homogenizador Ultra-Turrax ajustado en 9. El homogenizado se filtró a través de una capa doble de gasa. Después de adicionar KCl 4 M (disuelto en solución 1) hasta alcanzar una concentración final de 1.25 M, el homogenizado fue lentamente agitado (en hielo) por 10 minutos y centrifugado a 9,000 x g x 10 min a 4°C, en una centrifuga Sorvall RC-5B. La pastilla resultante se resuspendió en solución 1 que contenía KCl 1.25 M, y se mantuvo en hielo por 10 min. Posterior a esta incubación, la suspensión fue centrifugada a 4,000 x g x 10 min a 4°C. La pastilla resultante de esta centrifugación, se resuspendió en 30 volúmenes de solución 1 para ser centrifugada a 3,000 x g x 10 min a 4°C (repetiéndose dos veces). La pastilla resultante se resuspendió en sacarosa 0.4 M (disuelta en solución 1), y se sometió a centrifugación en gradientes de sacarosa, las concentraciones de sacarosa utilizadas fueron 1.17, 1.39, 1.60 y 1.83 M, preparadas con solución 1 ajustado a pH 8.2 (solución 2). Una vez formados los gradientes a 4°C, se distribuyó la preparación cruda en la superficie del gradiente 1.17 M, y se centrifugó a 40,000 x g x 60 min a 4°C en una centrifuga Beckman LB-M empleando un rotor SW 27.1. Posterior a este paso, la banda o fracción movilizada a la interfase 1.60 a 1.83 M de sacarosa, se resuspendió con solución 1, y se centrifugó a 9,000 x g x 10 min a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en sacarosa 0.4 M (disuelta en solución 1) y se centrifugó a 40,000 x g x 10 min a 4°C en un segundo gradiente con 1.39, 1.53, 1.60 y 1.83 M de sacarosa (preparadas con solución 2). Se retiró la fracción ubicada

en la interfase de 1.53 a 1.60 M de sacarosa, se resuspendió en solución 1. Esta fracción final se centrifugó a $9,000 \times g \times 10 \text{ min}$ a 4° y la pastilla final recuperada en solución 1. Se prepararon alicuotas de esta última fracción, las que se almacenaron a -72°C en un ultracongelador REVCO hasta su ulterior uso (dos semanas).

Esta fracción ha sido previamente caracterizada en nuestro laboratorio con base en sus actividades enzimáticas intrínsecas, en comparación con preparaciones de retículo sarcoplásmico y mitocondria. Los resultados de esta caracterización han demostrado que la fracción obtenida corresponde a una fracción enriquecida de sarcolema (105).

3. Solubilización de la fracción sarcolemal y cromatografía en columna.

La fracción de membranas (sarcolema), se solubilizó mediante una solución de Tris 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM ajustada a pH 7.4 con HCl, que contenía Triton X-100 al 0.1% (concentración final). La solubilización se llevó a cabo durante 30 min en hielo con agitaciones suaves. Posteriormente el solubilizado de membranas se centrifugó a $60,000 \times g \times 30 \text{ min}$ a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8-M. El sobrenadante se recuperó, y se aplicó a una columna de $1.0 \times 10 \text{ cm}$ que contenía 5 ml de colestiril hemisuccinato-agarosa, previamente equilibrada con amortiguador de Tris 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 1mM, Triton X-100 0.1 % pH 7.4 (solución A). Durante todo el proceso de cromatografía se empleó una velocidad de flujo de 10 ml por hora, y se colectaron fracciones de 0.5 ml a 4°C .

Después de cargar la columna con las proteínas contenidas en el sobrenadante de 60,000 x g y de colectarse los picos A y B, ésta se lavó con solución A hasta que la densidad óptica del efluente fue despreciable (aproximadamente 25 ml de solución A). Para eluir las moléculas que se pegaron a la columna, ésta se lavó con un gradiente discontinuo de KCl (0.1, 0.3 y 1.0 M). Se colectaron fracciones en las condiciones ya indicadas. Las fracciones que contenían proteína se unieron, y se concentraron a 4°C por medio de una cámara de ultrafiltración Amicon y una membrana YM 5. El concentrado se repartió en alicuotas que se congelaron a -72°C en un ultracongelador REVCO. Después del gradiente de KCl, la columna se lavó con 250 ml de una solución de metanol al 90%, colectándose los 20 ml iniciales, los cuales fueron concentrados en las condiciones mencionadas.

4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas

Después de concentradas, las proteínas contenidas en las fracciones correspondientes al pico C se separaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 5 %, en condiciones nativas de acuerdo al método de Weber y Osborn (106), a 200 mA de corriente constante. Se aplicaron 40 a 50 µg de proteína por cada pozo y al concluir el tiempo de corrida, los geles que no fueron teñidos ni fijados se emplearon para experimentos de pegada de colesterol, así como para la extracción de cada una de las bandas CI, CII, CIII y CIV.

A partir de estos geles nativos sin teñir ni fijar, en comparación con geles teñidos corridos en las mismas condiciones,

se cortaron en sentido longitudinal en la región correspondiente a cada una de las cuatro fracciones antes mencionadas. Las cuatro tiras de gel obtenidas se seccionaron y se homogenizaron con un homogenizador Ultra-Turrax, y se dejaron a 4°C en 20 ml de amortiguador de fosfatos (NaHPO₄/NaH₂PO₄ 25 mM, pH 7.1). Las proteínas que difundieron del gel al amortiguador en 24 horas, fueron filtradas a través de filtros millipore (0.45 µm) y dializadas toda la noche contra agua destilada a 4°C. Finalmente las muestras fueron concentradas a 4°C por medio de una cámara de ultrafiltración Amicon y una membrana YM 5. Posteriormente se almacenaron a -72°C en un ultracongelador REVCO hasta su uso posterior.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Las proteínas contenidas en cada una de las fracciones fueron separadas en geles de poliacrilamida al 7.5 % de 140x140x1.5 mm, que contenían SDS al 0.1 % (107). Las condiciones de corrida fueron 30 mA de corriente constante y 10°C durante 3 horas. Al concluir la corrida, los geles fueron fijados y teñidos con plata según el método de Oakley y cols. (108).

6. Incorporación de colesterol a geles nativos.

Al concluir la electroforesis en condiciones nativas, los geles no teñidos ni fijados se incubaron por una hora a 37°C en un medio que contenía NaHPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M pH 7.1, dimetil sulfoxido al 20 %, colesterol 100 µM y 6 µCi de [7-³H]colesterol/ml. Posteriormente los geles fueron lavados tres veces con el mismo medio pero que no contenía colesterol y secados por medio de un secador de geles (Hoefer Scientific Instrumentes). Finalmente los

geles fueron cortados en secciones de 0.5 cm. Estas secciones se colocaron en viales, a los que se les añadió 5 ml de tritosol, y se contaron en un contador de sentelleo líquido (Packard). Los geles control fueron teñidos siguiendo el método de Oakley y cols. (108).

7. Incorporación de colesterol a liposomas reconstituidos con cada una de las fracciones.

Se incorporaron 10 µg de proteína de cada una de las diferentes fracciones CI, CII, CIII y CIV, en liposomas unilamelares de fosfatidilcolina/fosfatidilserina en una relación 9/1 previamente formados por medio de 30 minutos de sonicación, en un sonicador Bradsonic con baño de agua, enfriando en hielo cada 7 min. Se emplearon los siguientes controles: a) liposomas de fosfatidilcolina/fosfatidilserina (9/1); b) liposomas de la misma composición que contenían 10 µg de citocromo oxidasa; y c) liposomas adicionados con 10 µg de albúmina sérica bovina.

La incorporación de colesterol se llevó a cabo a 37°C en un medio que contenía plasma humano inactivado al 10 % (diluido con solución de fosfatos 50 mM pH 7.1), colesterol frío 0.2 mg/ml y [³H]colesterol. Después de cuatro horas de incubación, los liposomas se lavaron con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 por medio de un sistema de filtros millipore (0.45 µm). Los filtros una vez secos se transfirieron a viales donde se les añadió 5 ml de tritosol para ser contados en un contador Packard.

Con el fin de determinar la proteína incorporada, los liposomas fueron centrifugados a 108,000 x g x 45 min a 4°C en una ultracentrífuga TL-100, se recuperó la pastilla resultante, a la

que se le determinó la cantidad de proteína.

8. Obtención de anticuerpos anti-fracción CI

Con el fin de producir anticuerpos, la proteína CI obtenida a partir de geles nativos se inoculó a un borrego para inducir la respuesta inmune, de acuerdo al siguiente esquema de inmunización: 150 µg de proteína CI (en solución de fosfatos) se mezcló con un volumen igual de adyuvante completo de Freund hasta formar una emulsión. Esta emulsión se inoculó al borrego por vía subcutánea en el pliegue inguinal. Dos semanas más tarde, el borrego se sangró a través de la vena yugular, y la inmunoreactividad del suero se ensayó en placas de Duchterlony (109). Segunda inmunización: 15 días después de la primera inmunización se reinmunizó al borrego con 150 µg de proteína CI con adyuvante incompleto de Freund por la misma vía. Una semana después se sangró nuevamente el borrego de la manera mencionada para investigar el título de anticuerpos. Tercera inmunización, ésta se llevó a cabo con 100 µg de proteína CI y adyuvante incompleto de Freund, por la vía ya mencionada.

Con el objeto de mantener el título de anticuerpos anti-CI, y con miras en estudios posteriores, el borrego ha sido inmunizado mensualmente.

9. Reacciones de inmunoprecipitación en gel

Con el fin de averiguar la presencia de anticuerpos anti-CI, los sueros obtenidos se diluyeron de manera seriada con solución salina de fosfatos (PBS), y se pusieron a reaccionar con el antígeno (CI) en placas de agarosa al 1.5% durante 24 hrs, a temperatura ambiente y en cámara húmeda (109). Posteriormente,

las placas fueron lavadas con 6 cambios de solución salina al 0.85% a 4°C. Finalmente fueron teñidas con azul de coomassie.

10. Determinación de proteínas.

Todas las determinaciones de proteína se hicieron de acuerdo al método de Bensadoun y Weinstein (109), usando como estandar albúmina sérica bovina.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de la fracción sarcolemal de músculo cardíaco mediante solubilización con Triton X-100 y centrifugación diferencial, se obtuvo una mezcla de proteínas sarcolemales para ser separadas por medio de cromatografía en columna mediante una resina de colesterol hemisuccinato-agarosa. Como se observa en la figura 6, inicialmente eluyen de la columna tres picos de proteína denominados como A, B y C.

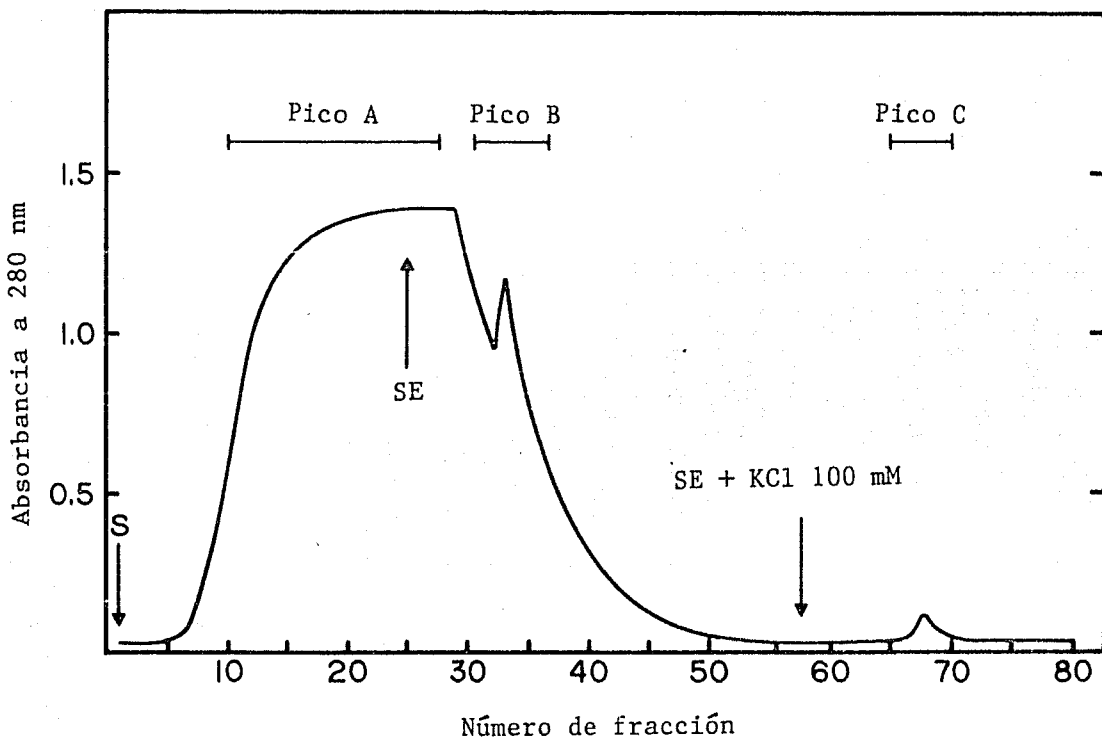


Figura 6. Perfil de elución del solubilizado sarcolemal a través de una columna de colesterol hemisuccinato-agarosa. S, sobrenadante de 60,000 x g; SE, solución de elución.

Después de coleccionar los dos primeros picos A y B que representan un 70% de la proteína total del sobrenadante de 60,000 x g y de lavar exhaustivamente la columna con una solución de Tris 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 0.1% pH 7.4, se cambió la fuerza iónica del amortiguador, al incrementar la concentración de KCl de 10 a 100 mM. Bajo estas condiciones eluyó de la columna un tercer pico de proteína denominado como C, el cual representa a un grupo de proteínas retenidas inicialmente por la columna, correspondientes a un 15% de la proteína aplicada a la columna.

De la misma manera, al cambiar la concentración de KCl de la solución de elución a 0.3 y 1 M se obtuvieron otros dos picos de proteína los cuales representan el 10 y 5% del total de proteína inicialmente aplicada a la columna. Estos picos no se muestran en la figura 6, en vista de haber sido durante este estudio exclusivamente investigadas las características de los componentes del pico C.

Los picos de proteína obtenidos de la columna de colestiril hemisuccinato-agarosa, fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, de donde se obtuvo un patrón electroforético como el mostrado en la figura 7. En este gel se puede apreciar que cada uno de los picos que eluye de la columna, está formado por varias proteínas.

Un análisis más detallado de este gel nos muestra inicialmente que, durante la solubilización de las membranas y la centrifugación diferencial del solubilizado se eliminan básicamente los componentes de alto peso molecular (carriles B y C).

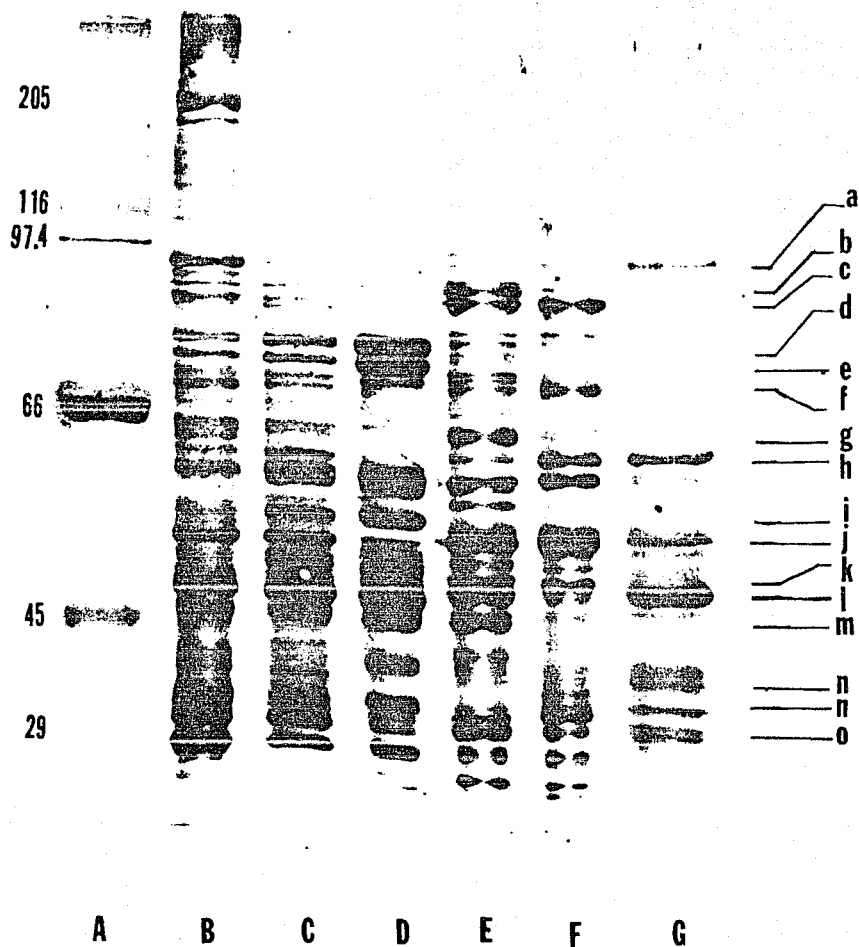


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% con SDS de las fracciones eluidas de la columna de colestiril hemisuccinato-agarosa. A) marcadores de peso molecular; B) sarcolema cardíaco; C) sobrenadante de 60,000 x g; D) picos A-B; E) pico C (KCl 0.1 M); F) pico D (KCl 0.3 M); G) pico E (KCl 1 M). En cada pozo se aplicaron 25 μ g de proteína excepto para el pozo A en el que se emplearon 10 μ g. Las letras en la parte derecha corresponden a las bandas de proteína referidas en el texto (experimento representativo de 10).

Por otro lado, durante la elución de las proteínas del sobrenadante de 60,000 x g a través de la columna, se puede observar claramente como las proteínas son fraccionadas al emplear un gradiente discontinuo de KCl. De esta manera algunas fracciones de proteína se enriquecen mientras que otras desaparecen, es decir, eluyen de la columna de manera gradual. Por ejemplo, las bandas de proteína (d, e, j y ñ) (figura 7), no son ni parcialmente retenidas por la columna, mientras que otras proteínas son parcialmente retenidas por la columna. En específico, las bandas de proteína denominadas como (b, f, g y m) (figura 7) eluyen de la columna prácticamente en su totalidad con KCl 100 mM. Otras proteínas (c, f, i, k, l y o) son muy evidentes en las fracciones que eluyen con KCl 0.1 y 0.3 M y finalmente las proteínas (a, h y n) (figura 7) aparentemente tienen mayor afinidad por la columna, ya que eluyen de ésta con KCl 1 M.

Se decidió emplear un gradiente de KCl para liberar las moléculas unidas a la columna, en lugar de haber empleado colesterol para liberar específicamente las posibles moléculas afines a este esteroide, debido a que se ha mencionado (111) que concentraciones altas de sal pueden romper todas las interacciones no hidrofóbicas entre el ligando inmovilizado y la proteína. Al incrementar la concentración de sal, aparentemente se favorecen las interacciones hidrofóbicas. Sin embargo la sal normalmente desplaza las proteínas unidas a la resina. En el presente trabajo el gradiente de sal fue suficiente para liberar todas las proteínas retenidas por la columna, ya que el eluyente obtenido al lavar la columna con metanol al 90% no contenía proteínas. Lo que a su vez podría sugerir que las interacciones hidrofóbicas no

se favorecieron con el gradiente de KCl.

La razón principal por la que se empleó el gradiente de sal para liberar las moléculas unidas a la columna, fue la de tener en mente la realización de experimentos de pegada y transferencia de colesterol, por lo que se pensó recuperar de la columna las proteínas libres de dicho esterol para poder determinar si alguna de estas proteínas tenía afinidad por éste.

Se han empleado exitosamente columnas de este mismo material para separar a la enzima colesterol oxidasa y lipoproteínas del plasma, en cuyo caso la liberación de la enzima o la partícula se logró mediante la adición de detergentes (112,113). En vista de haber empleado en el presente estudio un detergente como lo es el Triton X-100 para mantener en solución a las proteínas extraídas de las membranas, es probable que la presencia de este detergente haya modificado las propiedades de la columna.

Al considerar que las proteínas retenidas por la columna correspondientes al pico C fueron las primeras en eluir de ésta, se decidió iniciar la búsqueda de proteínas afines por el colesterol en esta fracción. Por consiguiente, se realizó un estudio sistemático exclusivamente de los componentes de esta fracción (pico C), y se dejó para un futuro las otras fracciones que eluyen de la columna con mayor fuerza iónica.

Con base en lo anterior, las proteínas contenidas en el pico C fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas con el objeto de llevar a cabo un siguiente paso de purificación. Bajo estas condiciones, se observa que de las múltiples bandas obtenidas en el sistema de geles con SDS, únicamente cuatro migran en estos geles. Estas cuatro bandas o

Una vez conocida la migración electroforética de las proteínas contenidas en el pico C en condiciones nativas, se decidió investigar si bajo estas condiciones alguna de las fracciones antes mencionadas presentaba afinidad por el colesterol, para lo que se empleó [3 H]colesterol.

De manera interesante se encontró que de las cuatro fracciones, la correspondiente a CI fue capaz de unir colesterol aún estando embebida en el gel, este fenómeno de unión de colesterol no se observó en las fracciones CII, CIII y CIV (figura 9).

Este resultado por primera vez sugirió la presencia de una proteína con afinidad por colesterol contenida en el solubilizado de sarcolema cardíaco.

A pesar de que no se logró (debido a la ausencia de detergentes y reductores) la calibración del sistema de los geles nativos con los marcadores de peso molecular, la secuencia aparente en el peso molecular entre las fracciones CI, CII, CIII y CIV (figuras 8 y 9), sugirió la posibilidad de contar con una proteína multimérica (CI), considerando que las fracciones CII, CIII y CIV podrían representar subfracciones de esta misma proteína. Con base en lo anterior y al resultado que se obtuvo al usar [3 H]colesterol (figura 9), se decidió extraer de los geles nativos las cuatro fracciones antes mencionadas.

Con la finalidad de apoyar experimentalmente la posibilidad de contar con una proteína multimérica, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de las fracciones CI, CII, CIII y CIV, las cuales previamente habían sido extraídas de los geles nativos.

fracciones se han denominado CI, CII, CIII y CIV (figura 8).

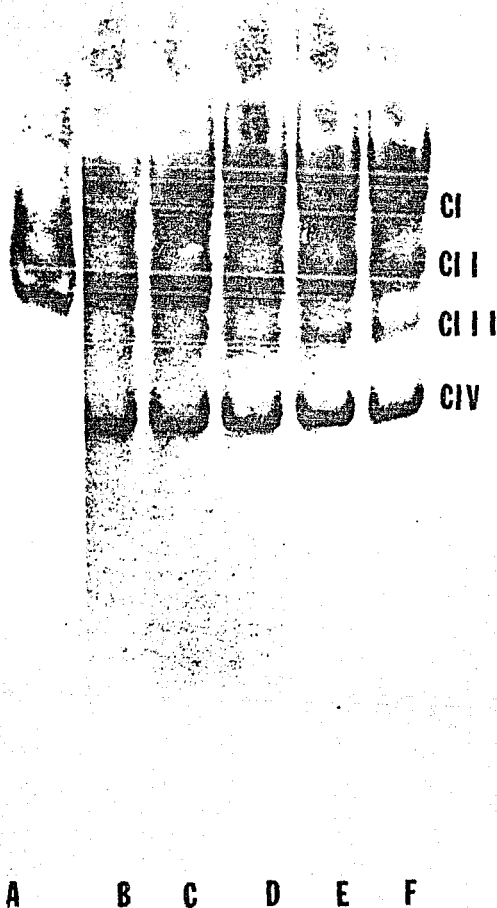


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% en condiciones nativas de la fracción del pico C. A) marcadores de peso molecular ($20\mu\text{g}$); B-F fracción de proteínas del pico C, se aplicaron de 40 a $50\mu\text{g}$ de proteína en cada pozo. CI, CII, CIII y CIV corresponden a las fracciones referidas en el texto (experimento representativo de 20).

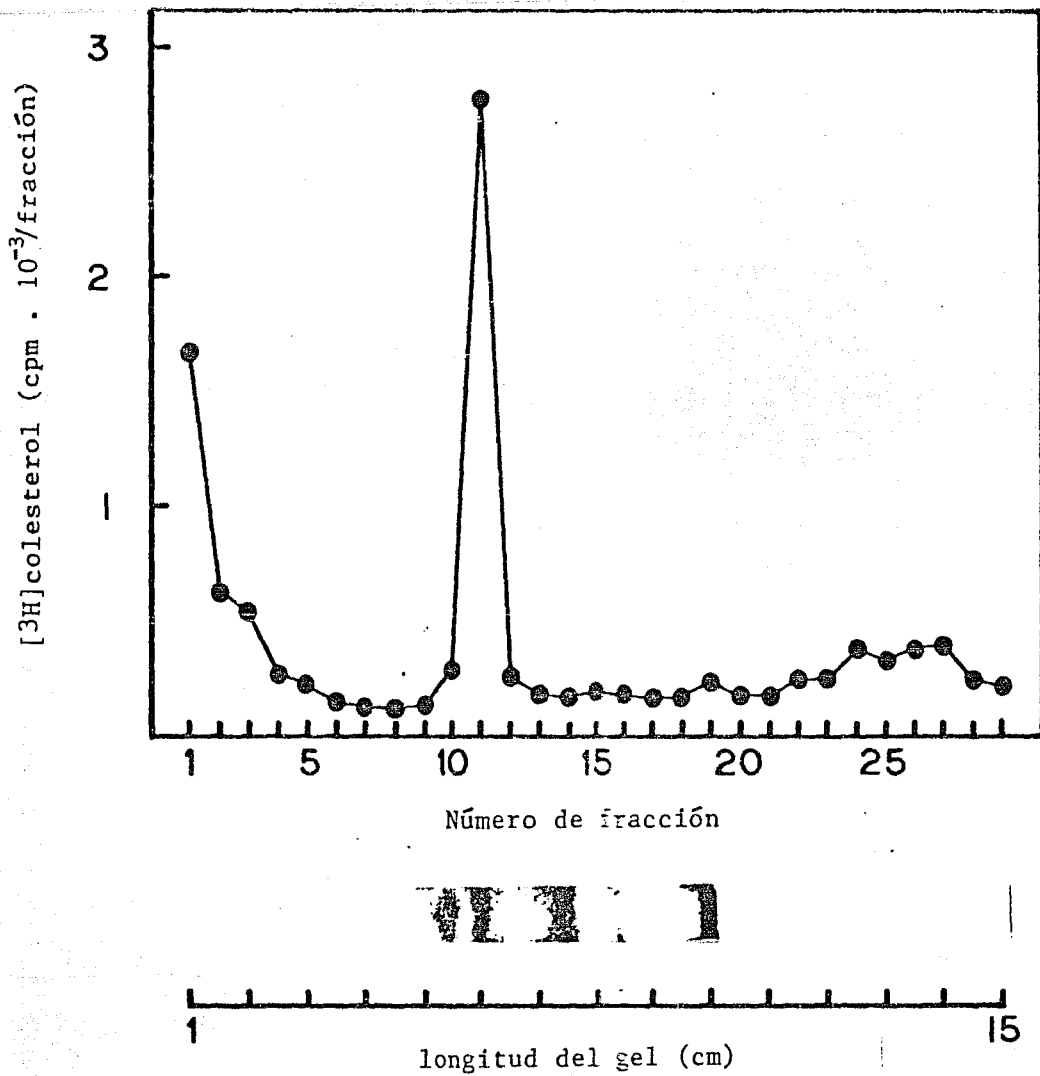


Figura 9. Incorporación de $[^3\text{H}]$ colesterol a geles nativos. De izquierda a derecha las bandas en el gel corresponden a CI, CII, CIII y CIV (experimento representativo de 3).

Después de someter a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS a las cuatro fracciones CI, CII, CIII y CIV y de teñir estos geles con plata (108), se observó de manera sumamente interesante que el bandeo de las cuatro fracciones correspondía principalmente a una proteína con un peso molecular aparente de 73 kDa (figura 10).

Es importante comentar, que al emplear este sistema de geles en presencia de SDS, en algunas ocasiones de los múltiples geles realizados, se observó en la preparación de la fracción de proteína CI una banda con un peso molecular aproximado de 47 kDa adicional a la banda de proteína siempre presente de 73 kDa. Al respecto se pensó que esta proteína de 47 kDa pudiera ser un producto de la proteólisis, ya que no se emplearon inhibidores de proteasas, o bien a las condiciones en las que se realizó el corte de la banda correspondiente a la proteína CI de los geles nativos, en las que pudo haber errores de apreciación en el momento de realizar dicho corte.

Los resultados mostrados en la figura 10, en los que se observa que las cuatro fracciones CI, CII, CIII y CIV migran a una misma posición en los geles de poliacrilamida con SDS apoyan fuertemente la posibilidad de contar con una proteína multimérica.

Al tomar como base el peso molecular de 73 kDa de la proteína purificada en este estudio, podría ser posible establecer una comparación entre esta proteína y la proteína que transfiere ésteres de colesterol, la cual ha sido aislada a partir de plasma de humano y a la cual se le ha determinado un peso molecular de 74 kDa (101,103). Para lograr esta posible comparación es

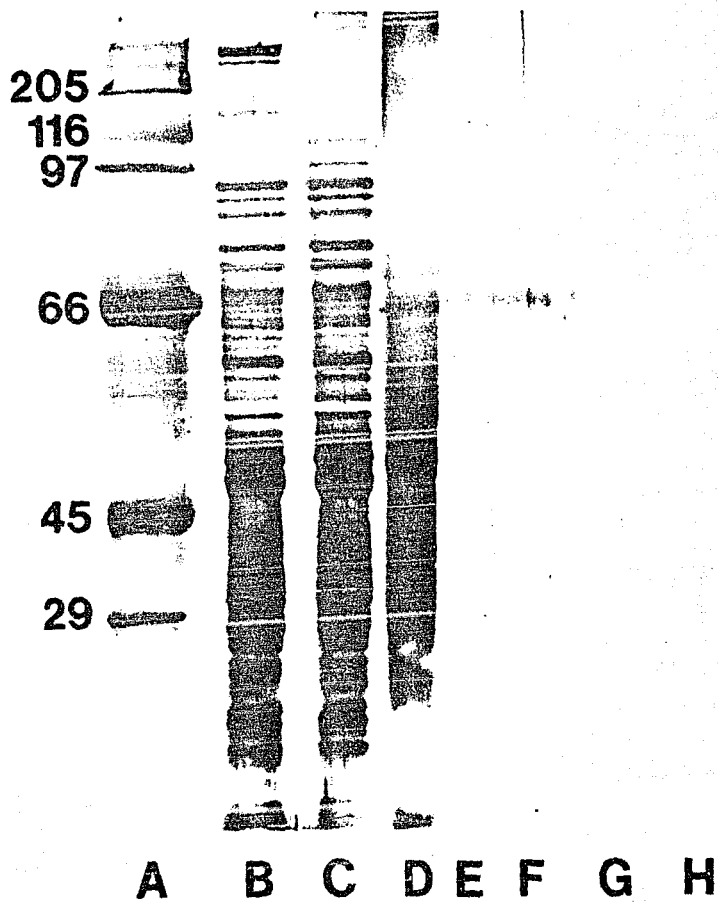


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% con SDS de las fracciones CI, CII, CIII y CIV. A) marcadores de peso molecular (10 μ g); B) fracción sarcolemal (25 μ g); C) sobrenadante de 60,000 x g (20 μ g); D) pico C (10 μ g); E) fracción CI (2 μ g); F) fracción CII (2 μ g); G) fracción CIII (2 μ g); H) fracción CIV (2 μ g) (representativo de 20 experimentos).

necesario realizar una caracterización exhaustiva de la proteína CI, la cual se llevará a cabo en nuestro laboratorio durante los próximos meses.

Al partir de los resultados que se muestran en la figura 10 y tratar de reforzar la posibilidad de contar con una proteína activa en estado multimérico, las cuatro fracciones CI, CII, CIII y CIV, fueron reconstituidas en liposomas para así estudiar la capacidad de cada una de las fracciones en relación con la transferencia de colesterol. De esta manera se encontró que únicamente la fracción CI fue capaz de aumentar la incorporación o transferencia de colesterol del medio de incubación a las membranas artificiales. En contraste las fracciones CII, CIII y CIV no mostraron aumento en la incorporación de colesterol (figura 11). En esta misma figura, se observa que los controles utilizados de liposomas adicionados con albúmina y de liposomas reconstituidos con citocromo oxidasa como una proteína control intrínseca de membrana, no favorecen la transferencia de colesterol del medio a las membranas, sino por el contrario, la albúmina parece inhibir la incorporación de colesterol a las membranas liposomales. El efecto dado por la albúmina probablemente esté relacionado con la capacidad de asociación y de transporte de ácidos grasos que tiene esta proteína. Estos datos permiten pensar que el aumento en la transferencia de colesterol dado por la proteína CI es específico, y que no se trata de un simple artefacto dado por la presencia de una proteína intrínseca en las membranas liposomales. Ya que los liposomas per se incorporan en sus membranas moléculas de colesterol al encontrarse en un medio que contenga este esteroide, la cantidad de colesterol incorporada

por los liposomas control (no adicionados con proteína) se consideró como el valor basal. En los liposomas reconstituidos con cada una de las fracciones, este valor basal fue restado para observar únicamente el [^3H]colesterol transferido específicamente por cada una de las fracciones.

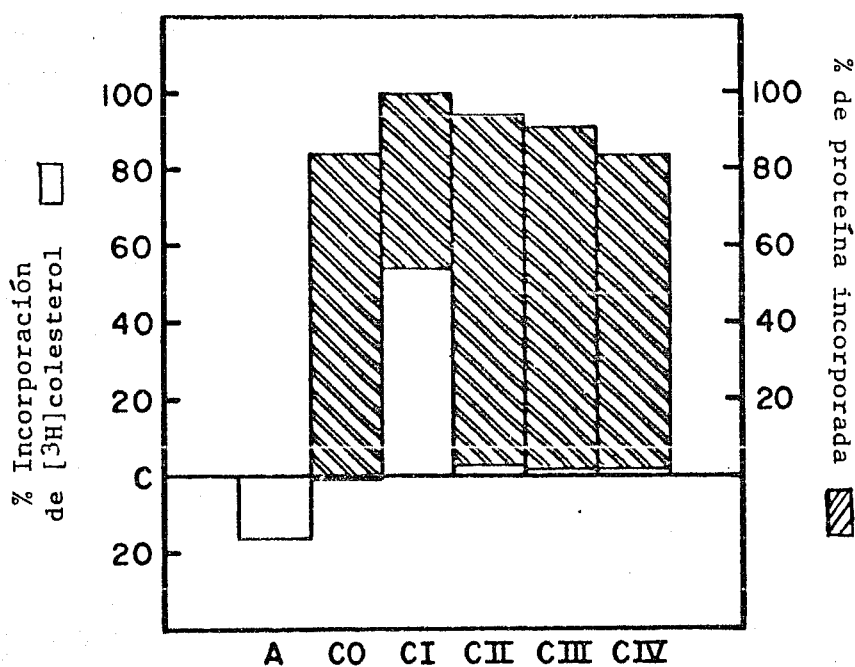


Figura 11. Incorporación de colesterol a liposomas reconstituidos con las fracciones CI, CII, CII y CIV. C) control; A) liposomas adicionados con albúmina; CO) liposomas reconstituidos con citocromo oxidasa; CI-CIV liposomas reconstituidos con cada una de las fracciones (experimento representativo de 3).

En las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento de transferencia de colesterol, al considerar que la proteína CI tiene un peso molecular de 73 kDa y que se incorpora entre un 70 y 90% en los liposomas, se ha determinado que esta proteína transfiere del medio a las membranas entre 98 y 127 pmolas de colesterol/pmola de proteína/h a 37°C. En vista de observar un aumento importante en la transferencia de colesterol en los liposomas reconstituidos con la proteína CI, a ésta se le ha denominado proteína transferidora de colesterol (CTP por Cholesterol Transfer Protein, ver anexo).

Adicionalmente se puede comentar que el tiempo empleado para llevar a cabo los experimentos de transferencia de colesterol (4 horas), corresponde al tiempo medio requerido para transferir más del 50% del colesterol del medio a las membranas liposomales (35).

La tabla II muestra el porcentaje de recuperación de proteína a lo largo del proceso de purificación. A partir de estos datos se puede comentar que el porcentaje de recuperación de la proteína CI es del orden de 0.15% en relación al total de proteína presente en la fracción sarcolemal. En vista de no poder determinar la actividad de la proteína CI a lo largo del proceso de purificación, no se puede establecer el grado de purificación de esta proteína, por lo que por el momento se ha concretado a expresar únicamente su porcentaje de recuperación.

TABLA II

Porcentaje de recuperación de proteína durante el procedimiento
 empleado para la purificación de la CI

| Muestra | mg de proteína | % |
|-------------------------------|----------------|--------------------|
| Sarcolema cardíaco | 100 | 100 |
| Sobrenadante de 60,000 x g | 26 | 26 ± 6.03 (n=8) |
| Pico C | 2.6 | 2.6 ± 0.41 (n=7) |
| CI | 0.15 | 0.15 ± 0.025 (n=5) |

Estos datos muestran el bajo rendimiento del procedimiento empleado en la extracción de la proteína CI de la fracción sarcolemal, siendo la separación y extracción de los geles nativos el paso limitante. Como se comentará más adelante, con la fortuna de contar con anticuerpos policlonales anti-proteína CI, se establecerá una nueva metodología para el aislamiento de la proteína CI por medio de cromatografía de afinidad antígeno-anticuerpo.

En la figura 12, se pueden observar los resultados obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación en gel con doble inmunodifusión. Claramente se puede apreciar la formación de una banda continua de precipitación al utilizar diluciones seriadas del antisuero y la proteína CI aislada. Estos resultados nos indican la pureza del antígeno (CI) empleado para la inmunización del borrego.

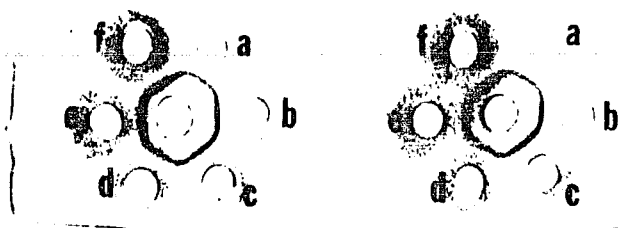


Figura 12. Doble inmunodifusión en placas de agarosa. Las letras indican diluciones del suero anti-fracción CI. a) 1:32; b) 1:16; c) 1:8; d) 1:4; e) 1:2; f) 1:1. En el pozo central se colocaron 5 μ g de la fracción CI (representativo de 5 experimentos).

Con el fin de investigar la especificidad del antisuero obtenido contra la proteína CI, se pusieron diluciones de este antisuero a reaccionar con albúmina sérica bovina y con ovoalbúmina en placas de Duchterlony (109). Mediante estos experimentos se encontró que las proteínas arriba mencionadas (albúmina y ovoalbúmina), no reaccionan con suero anti-proteína CI (resultados no mostrados). Esto indica que la especificidad que tiene el antisuero se debe a la presencia del anticuerpo correspondiente.

En vista de contar con anticuerpos anti-proteína CI, se están realizando experimentos de inmunotransferencia, mediante los cuales se explorará la posible presencia de CI en los picos D y E que eluyen de la columna de colestiril hemisuccinato-agarosa con KCl 0.3 y 1 M respectivamente.

V. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir:

1. Se ha purificado una proteína intrínseca de la membrana plasmática de la célula muscular cardíaca con afinidad por colesterol, denominada CTP.
2. La proteína CTP es capaz de transferir colesterol al ser reconstituida en membranas artificiales.
3. Los datos mostrados sugieren la posibilidad de que la CTP para ser activa necesita encontrarse en estado multimérico.
4. De manera exitosa se ha obtenido un anticuerpo policlonal anti-CTP, el cual será sumamente útil en el refinamiento del procedimiento de purificación, así como para la caracterización ulterior cinética y estructural de la proteína CTP.

VI. PERSPECTIVAS

Con base en las propiedades de la proteína CTP descritas en el presente trabajo, se piensa que esta proteína podría constituir un sistema totalmente nuevo en la regulación del contenido de colesterol de la membrana plasmática, no sólo de la célula muscular cardíaca, sino también en otros tipos celulares. Por lo anterior se considera de sumo interés el continuar con la caracterización de esta proteína, así como iniciar la exploración de su posible existencia en la membrana plasmática de otros tipos celulares.

Para llevar a cabo esto último, primeramente se establecerá una nueva metodología para la purificación de la proteína CTP, ya que el procedimiento hasta ahora empleado tiene una serie de desventajas en cuanto a rendimiento, tiempo y costos. Al respecto se piensa que la cromatografía de afinidad antígeno-anticuerpo permitirá realizar un aislamiento específico y más rápido de la proteína CTP.

Para esto, se cuenta ya con sueros anti-CTP de donde se aislará una fracción de inmunoglobulinas G (IgGs). Una vez aisladas, estas inmunoglobulinas se acoplarán a una columna de sefarosa activada, mediante la cual se aislará la proteína CTP.

Al haber establecido y comprobado la eficiencia de esta metodología para la purificación de la proteína CTP, y con base en los resultados que se obtengan de los experimentos de inmunotransferencia, se intentará de ser el caso, purificar dicha proteína a partir de membranas de otros tipos celulares.

Al haber resuelto el problema del aislamiento preparativo de

la proteína CTP, se iniciará el estudio sistemático de la cinética de asociación-disociación del complejo CTP-colesterol. Por medio de los métodos ya bien descritos de equilibrio de diálisis y filtración Millipore.

Con el uso de las IgGs anti-CTP mediante técnicas inmunológicas, se explorará la posible relación entre CTP y las diferentes apolipoproteínas, así como con otras proteínas que facilitan el recambio de lípidos.

De poder demostrar un papel claro de la proteína CTP en la homeostasis del colesterol en células normales, resultará de interés el estudiar si cambios de esta proteína pueden estar relacionados con el desarrollo de la hipercolesterolemia.

VII. REFERENCIAS

1. Cook, R.P. (1958) Cholesterol. Academic Press, p. 542. New York.
2. Kellie, A.E. (1984) In: Biochemistry of Steroid Hormones, 2^a Ed. (H.L.J. Makin Ed.) Blackwell Cientific Publications, pp. 1-19, Great Britain.
3. Shiga, T. y Maeda, N. (1980) Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions, *Biorheology* 17, 485-499.
4. Rooney, M.W., Lange, Y. y Kauffman, J.W. (1984) Acyl chain organization and protein secondary structure in cholesterol-modified erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 259, 8881-8885.
5. Cornell, B.A., Davenport, J.B. y Separovic, F. (1982) Low frequency motion in membranes, the effect of cholesterol and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 689, 337-345.
6. Melchoir, D.L. y Czech, M.P. (1979) Sensitivity of the adipocyte D-glucose transport system to membrane fluidity in reconstituted vesicles. *J. Biol. Chem.* 254, 8744-8747.
7. Grunze, M., Forst, B. y Deuticke, B. (1980) Dual effect of membrane cholesterol on simple and mediated transport processes in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 600, 860-869.
8. Papahajopoulos, D., Gowden, M. y Kimlberg, H. (1973) Role of cholesterol in membranes, effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 8-26.
9. Flaherty, J.D., Barrett, E.J., Bradley, D.P. y Headon, D.R.

- (1975) Association of basal ATPase activity and cholesterol with a distinct group of rabbit muscle microsomal particles. *Biochim. Biophys. Acta* 401, 177-183.
10. Madden, T.D., King, M.D. y Quinn, P.J. (1981) The modulation of Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum by membrane cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 641, 265-269.
 11. Yeagle, P.L. (1983) Cholesterol modulation of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 727, 39-44.
 12. Ortega, A. y Mas-Oliva, J. (1984) Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase from cardiac muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 773, 231-236.
 13. Ortega, A. y Mas-Oliva, J. (1986) Direct regulatory effect of cholesterol on the calmodulin stimulated calcium pump of cardiac sarcolemma. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 139, 868-874.
 14. Kroes, J. y Ostwald, R. (1971) Erythrocyte membranes-effect of increased cholesterol content on permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 647-650.
 15. Scarpa, A. y DeGier, J. (1971) Cation permeability of liposomes as a function of the chemical composition of the lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 241, 789-797.
 16. DeKruyff, B., Demel, R.A. y Van Deenen, L.L.M. (1972) The effect of cholesterol y epicholesterol incorporation on the permeability and on the phase transition of intact Acholeplasma laidlawii cell membrane and derived liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 255, 331-347.
 17. Esser, A.F., Bartholomew, R.M., Parce, J.W. y McConnell,

- H.M. (1979) The physical state of membrane lipids modulates the activation of the first component of complement. *J. Biol. Chem.* 254, 1768-1770.
18. Madden, T.D., Chapman, D. y Quinn, P.J. (1979) Cholesterol modulates activity of calcium dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 279, 538-541.
19. Hesketh, T.R., Smith, G.A., Houslay, M.D., McGill, K.A., Birdsall, N.J.M., Metcalfe, J.C. y Warren, G.B. (1976) Annular lipids determinate ATPase activity of a calcium transport protein complexed with dipalmoylecithin. *Biochemistry* 15, 4145-4151.
20. Harkes, L. (1985) Interaction of low density lipoproteins with rat cells. Tesis Doctoral. Universidad de Rotterdam, Holanda, p. 102.
21. Mahley, R.W. y Innerarity, T.L. (1983) Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 737, 197-222.
22. Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1974) Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254, 5153-5162.
23. Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1985) The LDL receptor and HMG-CoA reductasa. Two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. *Curr. Top. Cell. Regul.* 26, 3-15.
24. Schneider, W.J., Beisiegel, W., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1982) Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J. Biol. Chem.* 257, 2664-2673.

25. Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J., Hobgood, K.K., Tolleshaug, H., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1983) Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 258, 15261-15273.
26. Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1977) The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
27. Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1976) Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblast and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2434-2438.
28. Brown, M.S., Anderson, R.G.W. y Goldstein, J.L. (1983) Recycling receptor: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell.* 32, 663-667.
29. Tolleshaug, H., Goldstein, J.L., Schneider, W.J. y Brown, M.S. (1982) Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell.* 30, 715-724.
30. Tolleshaug, H., Hobgood, K.K., Brown, M.S. y Goldstein, M.S. (1983) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell* 32, 941-951.
31. Attie, A.D., Pittman, R.C., Watanabe, Y. y Steinberg, D. (1981) Low density lipoprotein receptor deficiency in cultured hepatocytes of the WHHL rabbit. *J. Biol. Chem.* 256, 9789-9792.

32. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Brown, M.S., Innerarity, T.L. y Mahley, R.W. (1980) Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine β -very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 255, 1839-1848.
33. Bersot, T.P., Innerarity, T.L., Mahley, R.W. y Richard, J. (1983) Cholesteryl ester accumulation in mouse peritoneal macrophages induced by β -migrating very low density lipoprotein from patients with atypical dysbetalipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 72, 1024-1033.
34. Brown, M.S. Ho, Y.K. y Goldstein, J.L. (1980) The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. *J. Biol. Chem.* 255, 9344-9352.
35. Phillips, M.C., Johnson, W.J. y Rothblat, G.H. (1987) Mechanisms y consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 906, 223-276.
36. Backer, J.M. y Dawidowicz, E.A. (1981) Mechanisms of cholesterol exchange between phospholipid vesicles. *Biochemistry* 20, 3805-3810.
37. McLean, L.R. y Phillips, M.C. (1981) Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 20, 2893-2900.
38. Bruckdorfer, K.R., Crowe, J. y Sherry, M.K. (1984) Evidence for a water-soluble intermediate in exchange of cholesterol between membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 778, 489-496.
39. Haran, N. y Shporer, M. (1977) Proton magnetic resonance study of cholesterol transfer between egg yolk lecithin

- vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 465, 11-18.
40. McLean, L.R. y Phillips, M.C. (1982) Cholesterol desorption from clusters of phosphatidylcholine and cholesterol in unilamellar vesicle bilayer during lipid transfer exchange. *Biochemistry* 21, 4055-4059.
 41. Tanaka, Y. y Schroit, A.J. (1986) Calcium/phosphate-induced immobilization of fluorescent phosphatidylserine in synthetic bilayer membranes, inhibition of lipid transfer between vesicles. *Biochemistry* 25, 2141-2148.
 42. Nichols, J.W. (1986) Low concentrations of bile salts increase the rate of spontaneous phospholipid transfer between vesicles. *Biochemistry* 25, 4596-4601.
 43. Wharton, S.A. y Green, C. (1982) Effect of sterol structure on the transfer of sterols and fosfolipids from liposomes to erythrocytes in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 711, 398-402.
 44. Fugler, L., Clejan, C. y Bittman, R. (1985) Movement of chfolesterol between vesicles prepared with different phospholipids or sizes. *J. Biol. Chem.* 260, 409-4102.
 45. Yeagle, P.L. y Young, J.E. (1986) Factors contributing to the distribution of cholesterol among phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 261, 8175-8181.
 46. McLean, L.R. y Phillips, M.C. (1984) Cholesterol transfer from small and large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 776, 21-26.
 47. Bittman, R., Clejan, S., Lund-Katz, S. y Phillips, M.C. (1984) Influence of cholesterol on bilayers of ester-an ether-linked phospholipids permeability and ¹³C-Nuclear magnetic resonance measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 772,

- 117-126.
48. Lund-Katz, S. y Phillips, M.C. (1984) Packing of cholesterol molecules in human high-density lipoproteins. *Biochemistry* 23, 1130-1138.
 49. Lund-Katz, S. y Phillips, M.C. (1986) Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoproteins. *Biochemistry* 25, 1562-1568.
 50. Lund-Kat, S., Hammerschlag, B. y Phillips, M.C. (1982) Kinetics and mechanisms of free cholesterol exchange between human serum high-and low-density lipoproteins. *Biochemistry* 21, 2964-2969.
 51. Bruckdorfer, K.R. y Green, C. (1967) The exchange of unesterified cholesterol between human low-density lipoproteins and rat erythrocyte "Ghosts". *Biochem. J.* 104, 270-277.
 52. Bojesen, E. (1982) Diversity of cholesterol exchange explained by dissolution into water. *Nature* 299, 276-278.
 53. Lange, Y., Molinaro, A.L., Chauncey, T.R. y Steck, T.L. (1983) On the mechanism of transfer of cholesterol between human erythrocytes and plasma. *J. Biol. Chem.* 258, 6920-6926.
 54. Gottlieb, M.H. (1980) Rates of cholesterol exchange between human erythrocytes and plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 600, 530-541.
 55. Clejan, S. y Bittman, R. (1984) Kinetics of cholesterol and phospholipid exchange between Mycoplasma gallisepticum cells and lipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 259, 441-448.
 56. Clejan, S. y Bittman, R. (1984) Distribution and movement of sterols with different side chain structure between the two

- leaflets of the membrane bilayer of mycoplasma cells. *J. Biol. Chem.* 259, 449-455.
57. Bittman, R. y Clejan, S. (1987) Kinetics of cholesterol and phospholipid exchange between mycoplasma membrane and lipid vesicles. *Isr. J. Med. Sci.* 23, 398-402.
58. Slutzky, G.M., Razin, S., Kahane, I. y Eisenberg, S. (1977). Cholesterol transfer from serum lipoproteins to mycoplasma membrans. *Biochemistry* 16, 5158-5163.
59. Jackson, R.C., Gotto, A.M., Stein, D. y Stein, Y. (1975) A comparative study on the removal of cellular lipids from Landschütz ascites cells by human plasma apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* 250, 7204-7209.
60. Lange, Y. y Ramos, B.V. (1983) Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. *J. Biol. Chem.* 258, 15130-15134.
61. Robertson, D.L. y Poznansky, M.J. (1985) The effect of non-receptor mediated uptake of cholesterol on intracellular cholesterol metabolism in human skin fibroblasts. *Biochem. J.* 232, 553-557.
62. Slotte, J.P., Lundberg, B. y Björkerud, S. (1984) Intracellular transport and sterification of exchangeable cholesterol in cultured human lung fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 793, 423-428.
63. Slotte, J.P. y Lundberg, B. (1987) Transfer of [³H]cholesterol between lipid vesicles and rat arterial smooth muscle cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 750, 434-439.
64. Rothblat, G. H. y Phillips, M. C. (1982) Mechanism of cholesterol efflux from cells. *J. Biol. Chem.* 257, 4775-

4782.

65. Bellini, F., Phillips, M. C., Pickell, C. y Rothblat, G. H. (1984) Role of the plasma membrane in the mechanism of cholesterol efflux from cells. *Biochim. Biophys. Acta* 777, 209-215.
66. Gwynne, J. T. y Hess, B. (1980) The role of high density lipoprotein in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* 255, 10875-10883.
67. Glass, C., Pittman, R. C., Weinstein, B. y Steinberg, D. (1983) Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: Selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal and gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 5435-5439.
68. Glass, C., Pittman, R. C., Liven, M. y Steinberg, D. (1985) Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 744-750.
69. Schuler, L.A., Langenberg, K. K., Gwynne, J. T. y Strauss, J. F. (1981) High density lipoproteins utilization by dispersed rat luteal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 664, 583-601.
70. Azhar, S. y Menon, K.M.J. (1981) Receptor-mediated gonadotropin action in the ovary. *J. Biol. Chem.* 256, 6548-6555.
71. Nestler, J. E., Chacko, G. K. y Strauss, J. F. (1985) Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high

- density lipoproteins modified with tetranitromethane. *J. Biol. Chem.* 260, 7316-7321.
72. Slotte, J. P., Dram, J. F. y Bierman, E. L. (1987) Binding of high density lipoproteins to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intracellular membranes to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 262, 12904-12907.
73. Brinton, E. A., Dram, J. F., Chen, C. H., Albers, J. J. y Bierman, E. L. (1986) Binding of high density lipoprotein to cultured fibroblasts after chemical alteration of apoprotein amino acid residues. *J. Biol. Chem.* 261, 455-503.
74. Tabas, I. y Tall, A. R. (1984) Mechanism of the association of HDL₃ with endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259, 13897-13905.
75. Karlin, J. B., Johnson, W. J., Benedict, C. R., Chacko, G. K., Phillips, M. C. y Rothblat, G. H. (1987) Cholesterol flux between cells and high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 262, 12557-12564.
76. Ray, E., Bellini, F., Stoudt, G. Hemperly y Rothblat, G. (1980) Influence of lecithin: cholesterol acyltransferase on cholesterol metabolism in hepatoma cells on hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 617, 318-334.
77. Davis, R. A., Helgerod, P., Dueland, S. y Drevon, C. A. (1982). Evidence that reverse cholesterol transport occurs in vivo and requires lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 689, 410-414.
78. O'Malley, J. P., Soltys, P. y Portman, O. W. (1982) Interaction of free cholesterol and apoproteins of low and high density lipoproteins with isolated rabbit hepatocytes. *J.*

Lipid. Res. 22, 1214-1224.

79. Portman, D. W., Alexander, M. y O'Malley, J. P. (1980) Metabolism of free and sterified cholesterol and apolipoproteins of plasma low and high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 619, 545-558.
80. Arbeeny, C. M., Rifici, A. y Eder, H. A. (1987) The uptake of the apoprotein and cholesteryl ester of high density lipoproteins by the perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 917, 9-17.
81. Koo, C., Innerarity, T. L. y Mahley, R. W. (1985) Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor-active high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 260, 11934-11943.
82. Swartz, C. C., Halloran, L. G., Vlahcevic, Z. R., Gregory, D. H. y Swell, L. (1978) Preferential utilization of free cholesterol from high density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science* 200, 62-64.
83. Schwartz, C. C., Vlahcevic, Z. R., Halloran, G. y Swell, L. (1981) An in vivo evaluation in man of the transfer of sterified cholesterol between lipoproteins and into liver and bile. *Biochim. Biophys. Acta* 663, 143-162.
84. Scallen, T. J., Srikantaiah, M. V., Seetharam, B., Hansbury, E. y Gavey, K. L. (1974) Sterol carrier protein hypothesis. *Federation Proc.* 33, 1733-1746.
85. Johnson, R. C. y Shah, S. N. (1973) Evidence for participation of two soluble noncatalytic proteins in hepatic microsomal cholesterol synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

- 53, 105-111.
86. Johnson, R. C. y Shah, S. N. (1974) Microsomal synthesis of cholesterol from squalene, lanosterol and desmosterol. Arch. Biochem. Biophys. 164, 502-509.
 87. Srikantiah, M. V., Hansbury, E., Laoughran, E. D. y Scallen, T. J. (1976) Purification y properties of sterol carrier protein₁. J. Biol. Chem. 251, 5406-5504.
 88. Gavey, K. L. y Scallen, T. J. (1978) Studies on the conversion of enzymatically generated, microsome bound squalene to sterol. J. Biol. Chem. 253, 5476-5483.
 89. Ferguson, J. B. y Bloch, K. (1977). Purification and properties of a soluble protein activator of rat liver squalene epoxidase. J. Biol. Chem. 252, 5381-5385.
 90. Noland, B. J., Arebalo, R. E., Hansbury, E. H. y Scallen, T. J. (1980) Purification and properties of sterol carrier protein₂. J. Biol. Chem. 255, 4282-4289.
 91. Dempsey, M. E., McCoy, K. E., Baker, H. N. Dimitriadou-Vafiadow, A., Lorsbach, T. y Howard, J. B. (1981) Large scale purification and structural characterization of squalene and sterol carrier protein. J. Biol. Chem. 256, 1867-1873.
 92. Gaylor, J.L. y Delwiche, C. V. (1976) Purification of a soluble rat liver protein that stimulates microsomal 4-methyl sterol oxidase activity. J. Biol. Chem. 251, 6638-6645.
 93. Bloj, B., Hughes, M.E., Wilson, D.B. y Zilvermit, D.B. (1978) Isolation and amino acid analysis of a nonespecific phospholipid transfer protein from rat liver. FEBS Lett. 96,

87-89.

94. Bloj, B. y Zilversmith, D. B (1977) Rat liver proteins capable of transferring phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem.* 252, 1613-1619.
95. Chanderbhan, R., Noland, B. J., Scallen, T. J. y Vahouny, G. V. (1982) Sterol carrier protein₂, delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J. Biol. Chem.* 257, 8928-8934.
96. Vahouny, G.V., Chanderbhan, R., Noland, B. J., Irwin, D., Dennis, P., Lambeth, J. D. y Scallen, T. J. (1983) Sterol carrier protein₂, identification of adrenal sterol carrier protein₂ and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. *J. Biol. Chem.* 258, 11731-11737.
97. Pastuszyn, A., Noland, B. J., Bazan, J.F., Fletterick, R. J. y Scallen, T. J. (1987) Primary sequence and structural analysis of sterol carrier protein₂ from rat liver. Homology with immunoglobulins. *J. Biol. Chem.* 262, 13219-13227.
98. Westerman, J. y Wirtz, K.W.A. (1985) The primary structure of the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 333-338.
99. Van Amerogen, A., Helms, J. B., van der Krift, T. P. Schutgens, R. B. H. y Wirtz, K.W.A. (1987) Purification of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein₂) from human liver and its deficiency in livers from patients with cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome. *Biochim. Biophys Acta* 919, 149-155.
100. Erickson, S. K., Meyer, D. J. y Gould, R. G. (1977) Purification and characterization of a new cholesterol-binding

- protein from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 252, 1817-1826.
101. Hesler, C. B., Swenson, T. L. y Tall, A. R. (1987) Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Biol. Chem.* 262, 2275-2282.
102. Barter, P. J., Hopkins, G. J. y Calvert, D. G. (1982) Transfers and exchanges of sterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem. J.* 208-1-7.
103. Jarnagin, A. S., Kohr, W. y Fielding, C. (1987) Isolation and specificity of a Mr. 74,000 cholesteryl transfer protein from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1854-1857.
104. St. Louis y Sulakhe, P.V. (1976) Isolation of sarcolemmal membranes from cardiac muscle. *Int. J. Biochem.* 7, 547-558.
105. Mas-Oliva, J., Williams, A.J. y Nayler, W.G. (1979) ATP-induced stimulation of calcium binding to cardiac sarcolemma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 441-447.
106. Weber, K. y Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
107. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
108. Oakley, B.R., Kirsch, D.K. y Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105, 361-363.
109. Duchterlony, D. (1967) In handbook of experimental immuno-

logy, (Weir, D.M. Ed.), Blackwell Sci. Publ., Oxford & Edinburgh 655-706.

110. Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem. 70, 241-250.
111. Scopes, R.K. (1987) Protein purification, 2^a. Springer-Verlag, pp. 126-141. U.S.A.
112. Fukuyama, M. y Miyake, Y. (1979) Purification and some properties of cholesterol oxidase from Schizophyllum commune with covalently bound flavin. J. Biochem. 85, 1181-1193.
113. Wichman, A. (1979) Affinity chromatography of human low-and high-density lipoproteins. Biochem. J. 181, 691-698.

A N E X O

Por considerar que los resultados obtenidos durante la presente investigación constituyen la primera evidencia de una proteína de la membrana plasmática que favorece la transferencia de colesterol, en este anexo se incluye una copia del manuscrito enviado para su publicación a la revista *Biochim. Biophys. Acta.*

A NOVEL PROTEIN INVOLVED IN THE REGULATION OF THE CHOLESTEROL
CONTENT IN CARDIAC SARCOLEMMMA

J. Santiago-García and J. Mas-Oliva

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de
México, México, D.F. (México).

Correspondence: J. Mas-Oliva, Departamento de Bioenergética,
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de
México. Apartado Postal 70-600, 04510 Mexico, D.F. México.

J. Mas-Oliva: John Simmon Guggenheim Memorial Foundation Fellow.

A cholesterol transfer protein (CTP) has been isolated from a cardiac sarcolemmal fraction by detergent solubilization, column chromatography, and preparative electrophoresis using nondissociating polyacrylamide gels. In contrast to several sterol carrier proteins that have been isolated from soluble cytosolic fractions, a CTP must be reconstituted into an artificial membrane to mediate cholesterol transfer activity. A CTP also must be present in the membrane in a multimeric form for the expression of its full activity, since the monomer was shown not to be active. We believe that this novel protein might represent an important molecule in the regulation of the homeostasis of cholesterol in cardiac sarcolemma.

Several kinds of proteins that accelerate the exchange between membranes of different types of lipids have been purified and characterized [1,2]. Some of these cytosolic proteins have recently been used to study the distribution and transmembrane migration of phospholipids, fatty acids, and cholesterol [3,4].

Studies by Brown and Goldstein [5] have demonstrated that cholesterol homeostasis is regulated by two proteins: the cell surface receptor for the low-density lipoprotein that specifically binds this cholesterol-carrying lipoprotein, and the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, the rate-controlling enzyme in the internal synthesis of cholesterol [6]. However, although both the endogenous cholesterol synthesized in the endoplasmic reticulum [7] and the exogenous cholesterol are rapidly transported throughout the liver cell and are integrated in all intracellular membranes [8], the regulatory mechanisms for the transport of cholesterol, and specifically the way cholesterol is integrated and withdrawn from plasma membranes, are not well understood.

Rat liver cytosol contains several proteins called sterol carrier proteins (SCP). Sterol carrier protein-1 apparently participates in the microsomal conversion of squalene to lanosterol [9,10], and SCP-2 in the conversion of lanosterol to cholesterol [9,10]. Cholesterol-binding protein, also isolated from rat liver cytosol, has been reported to enhance the rate of cholesterol exchange between rat liver microsomes and mitochondria [11]. Because cytosols from several extrahepatic tissues including heart, have been shown to be immunoreactive to a cholesterol-binding protein antiserum [12], it has been suggested that this protein or a similar class of proteins might be involved in the intracellular transport of

cholesterol in different tissues. In light of the mechanism of transfer of cholesterol between the erythrocyte and plasma, it has been suggested that aqueous diffusion might govern the movement of cholesterol between compartments [13]. However, lipoproteins may also participate in the exchange process [14].

The present study describes the isolation and initial characterization of a CTP from cardiac muscle sarcolemma. This CTP binds cholesterol and, when reconstituted, facilitates the transfer of cholesterol from a serum/buffer system into artificial membranes. In contrast to the sterol carrier proteins and the cholesterol-binding protein isolated from the liver cell cytosol, CTP has to be solubilized from the sarcolemmal vesicles and reconstituted into an artificial membrane for observation of its transfer activity.

The procedure developed in this study for the isolation of the cholesterol-transfer protein consisted in the elution of a cholesteryl-hemisuccinate-agarose column (CHS-agarose column) with step changes in ionic strength. As shown with other systems, CHS-agarose can be used in the isolation of cholesterol oxidase and serum lipoproteins [15]. For the serum lipoproteins, specific desorption was achieved with detergents that apparently decrease the affinity of bound proteins to the adsorbent. Therefore, since we used the properties of the CHS-agarose for the selective separation of proteins in a detergent medium, our CHS-agarose column might be considered a weak affinity column.

Elution of the CHS-agarose column resulted in several protein peaks (Fig. 1). Peak C, which eluted with a 100 mM KCl buffer, was concentrated and dialyzed before being subjected to a further purification step employing preparative non-dissociating

polyacrylamide gel electrophoresis. Among the several bands obtained, four fractions called CI, CII, CIII, and CIV were recovered from these preparative gels (Fig. 2). The CI fraction was able to bind [³H]cholesterol while embedded in the acrylamide gel (Fig. 2). Although this system was not successfully calibrated with a set of molecular weight markers the sequence of molecular weights of CI, CII, CIII, and CIV suggested that these fractions might correspond to multiples of each other (Fig. 2). Therefore, the possibility of having isolated an active multimeric protein was considered.

Despite the differences in the apparent molecular weights of the different fractions when the non-dissociating preparative gels were employed (Fig. 2), all four fractions exhibited the same main band under dissociation conditions using SDS gels corresponding to a protein with a molecular weights of 73,000 when silver stained (Fig. 3). These results support the idea that under the conditions employed in this investigation, CTF isolated from cardiac sarcolemma corresponds to a protein active only in the multimeric form.

To further test this hypothesis, fractions CI, CII, CIII, and CIV were concentrated, dialyzed, and incorporated by sonication into preformed unilamellar liposomes after protein recovery from the preparative gels. In contrast to fractions CII, CIII, and CIV, which behaved like the control liposomes, fraction CI showed a great capacity to incorporate cholesterol into the liposomal membranes (Fig. 4). The incorporated CI fraction transferred 95.5 pmol of cholesterol/pmol of protein/hr. The addition of albumin to these liposomes interfered substantially with the incorporation of the CI fraction since the [³H]cholesterol incorporation values dropped below the control measurements of those without albumin. Moreover, the

reconstitution of cytochrome oxidase into the liposomal membranes, as a control measurement employing another integral membrane protein, did not increase the incorporation of [³H]cholesterol into the liposomal membranes (Fig. 4). These results support our early experiments showing the affinity of CTP for cholesterol and the necessity of having the protein in a multimeric form for the development of its full transfer activity. Since the transfer of cholesterol might be carried out via a pool of monomers present in the medium or through a diffusion mechanism between particles (lipoprotein-liposome), further work is needed to clarify whether the activity of CTP is dependent on any of these conditions. The immunologic characteristics of CTP in comparison with a series of lipoprotein apoproteins are currently being investigated.

On the basis of the main properties of CTP described in this study, we believe that this protein could represent an entire new system of regulation of the cholesterol content in cardiac sarcolemma. However, the presence of CTP in the plasma membrane of other cell types is also being investigated in our laboratory.

Since we have previously proposed that changes in the sarcolemmal cholesterol concentration might alter the equilibrium of cytoplasmic calcium through changes in the sarcolemmal calcium pump [16,17], we believe that alterations in the expression or regulation of CTP in the membrane might be of major biological significance in the normal physiology of the cardiac muscle cell.

We would like to thank Dr. Armando Gómez-Fuyou for his continuous advice, Dr. Antonio Peña for his generous gift of yeast cytochrome oxidase, and Mrs. M. Elena Gutiérrez for the secretarial work. This work was in part supported by a grant from CONACYT (PCEXCNA050747).

REFERENCES:

1. Zilversmit, D.B. & Gughes, M.E. (1976) in *Methods in Membrane Biology* (Korn, E.D. ed), Vol. 7 pp. 211-255, Plenum Press, New York.
2. Bloj, B. & Zilversmit, D.B. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1613-1619.
3. Rothman, J.E. & Dawidowicz, E.A. (1975) *Biochemistry* 14, 2809-2816.
4. Lenard, J. & Rothman, J.E. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 391-395.
5. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1986) *Science* 232, 34-47.
6. Goldstein, J.L. & Brown, M. S. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
7. O'Malley, B.W. & Means, A.R. (1974) *Science* 183, 610-620.
8. Colbeau, A., Nachbaur, J. & Vignais, P.M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249, 462-492.
9. Srickantaiah, M.V., Hansberg, E., Loughan, E.D. & Scallen, T.J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5496-5504.
10. Scallen, T.J., Noland, B.J., Gavey, K.L., Bass, N.M., Dckner, R.K., Chanderbhan, R. & Vahouny, G.V. (1985) *J. Biol. Chem.* 250, 4733-4739.
11. Bell, F.P. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 398, 18-27.
12. Erickson, S.K., Meyer, D.J. & Gould, R.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1817-1826.
13. Lange, Y., Molinaro, A.L., Chauncey, T.R. & Steck, T.L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6920-6926.
14. Lange, Y. & Matthies, J.G.H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14624-

14630.

15. Fukuyama, M. & Miyake, Y. (1979) *J. Biochem.* 85, 1183-1193
(1979).
16. Ortega, A. & Mas-Oliva, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 773,
231-236.
17. Ortega, A. & Mas-Oliva, J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
139, 868-874.
18. Weber, K. & Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
19. Bensandoun, A. & Weinstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 241-251.
20. Oakley, R.B., Kirsch, R.D. & Morris, R.N. (1980) *Anal. Biochem.*
105, 361-363.
21. Laemmli, U.K. (1970) *Nature Lond.* 227, 680-685.

FIGURES

Fig.1 Continuous elution profile of the sarcolemmal solubilized on a column (1.0 x 10.0 cm) containing 5 ml of cholesteryl-hemisuccinate-agarose (CHS-agarose). The enriched sarcolemmal preparation was isolated from New Zealand White rabbit hearts as previously described by us (16,17). The sample applied to the column consisted of 10-15 ml of the supernatant obtained by centrifugation ($60,000 \times g \times 30'$) of the detergent-treated sarcolemmal vesicles (11) contained in 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 and 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 (elution buffer, EB). The flow rate employed was 10 ml/hr, and 0.5 ml fractions were collected at 4°C. After chromatography of the sample and collection of peaks A and B, the column was washed with the same buffer until the optical density of the effluent was negligible. For elution, the gel was washed with 50 ml of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 0.1% Triton X-100 containing 1 mM EDTA, and increments in the ionic strength of the buffer employing 0.1, 0.2, and 1.0 M KCl (only peak C, corresponding to 0.1 M KCl, is shown). The protein load corresponds to 15 mg of solubilized protein from 43 mg of sarcolemmal vesicles. Peak C contains 835 µg of protein. Tubes containing eluted protein were pooled, concentrated at 4°C either with a YM5 Amicon membrane or a concentration bag Spectropor-3 and Aquacide, dialyzed against water, and tested for their cholesterol-binding activity in non-dissociating polyacrylamide gels.

Fig. 2 Non-dissociating polyacrylamide gel electrophoresis of peak C obtained from the CHS-agarose column. Five percent Weber and Osborn gels [18] were run at constant 200 mA. The protein load was 40-50 μ g, as measured by the Bensandoun and Weinstein method [19]. From left to right the dots in the gel correspond to fractions CI, CII, CIII and CIV. After electrophoresis, unfixed and unstained gels were incubated for one hour at 37°C in a medium containing 100 mM $\text{NaHPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.1), 20% DMSO (pH 7.1), 500 μ M cholesterol, and 10 μ Ci [^3H]cholesterol/ml (specific activity: 12 Ci/mmol). After this procedure, the gels were washed three times with the same buffer without [^3H]cholesterol, followed by slicing. Control gels were silver stained with the method described by Oakley et al [20]. Following the same procedure, we used unfixed and unstained sliced gels for the specific extraction and isolation of fractions CI, CII, CIII, and CIV. Minced gels were placed in 20 ml of a phosphate buffer (25 mM $\text{NaHPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.1), at 4°C for 48 hr, filtered through Millipore (0.45), dialyzed for 24 hr against water, and concentrated with an Amicon micro-concentration unit employing a YM5 membrane. In a typical experiment from two gels (14.0 x 14.0 x 0.15 cm) loaded with 1.6 mg of protein from peak C, between 70 and 100 μ g of CI fraction is obtained.

Fig. 3 Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of fractions CI, CII, CIII, and CIV obtained from the non-dissociating gel system. 7.5% Laemmli gels [21] were run at constant 30 mA and 10°C. The protein load was measured by the Bensandoun and Weinstein method [19]. After electrophoresis the gel was fixed and stained with the method described by Oakley et al [20]. a) molecular weight standards (5 µg); b) sarcolemmal fraction (10 µg); c) 60,000 g supernatant (10 µg); d) peak C (5 µg); e) fraction CI (1 µg); f) fraction CII (1 µg); g) fraction CIII (1 µg); h) fraction CIV (1 µg).

Fig. 4 [³H]cholesterol incorporation into preformed liposomes reconstituted with fractions CI, CII, CIII, and CIV. The different fractions obtained from the non-dissociating gel system were concentrated with a YM5 Amicon membrane, and dialyzed overnight against water at 4°C and 10 µg of protein incorporated into preformed unilamellar liposomes by 1 min sonication in a Brandsonic water bath sonicator set at full power and employing a 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The incorporated protein was measured following the Bensandoun and Weinstein method [19]. Using a lipid to protein ratio of 1,000/1, fractions CI, CII, CIII, CIV and cytochrome oxidase (CO) were sonicated with phosphatidylcholine/phosphatidylserine (9/1) liposomes, and the [³H]cholesterol transfer activity was measured immediately. (A) corresponds to the addition of 10 µg of albumin to the liposomal suspension. The incorporation procedure was followed at 37°C as previously described by us [16,17] employing [7-³H]cholesterol (specific activity: 12 Ci/mmol). At the end of the incubation period, the incorporated liposomes were placed on Millipore filters (0.45 µm) and thoroughly washed with a 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The filters were transferred to scintillation vials, and 5 ml of tritosol was added before counting in a Packard scintillation counter.

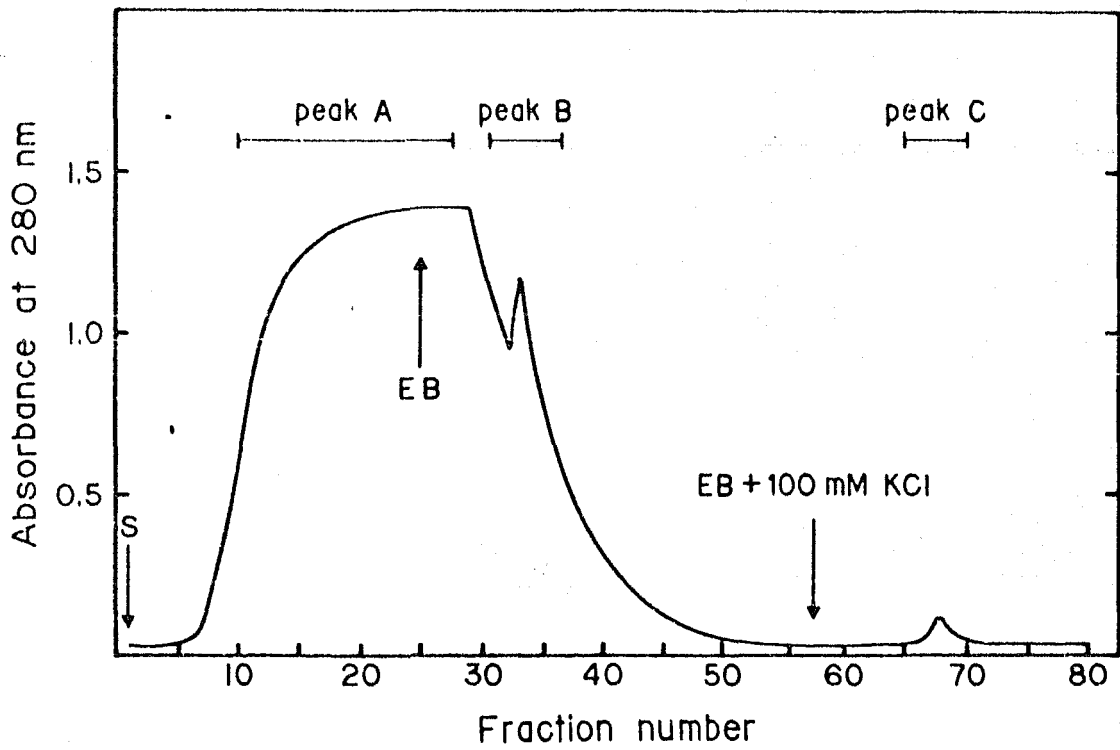


Fig. 1

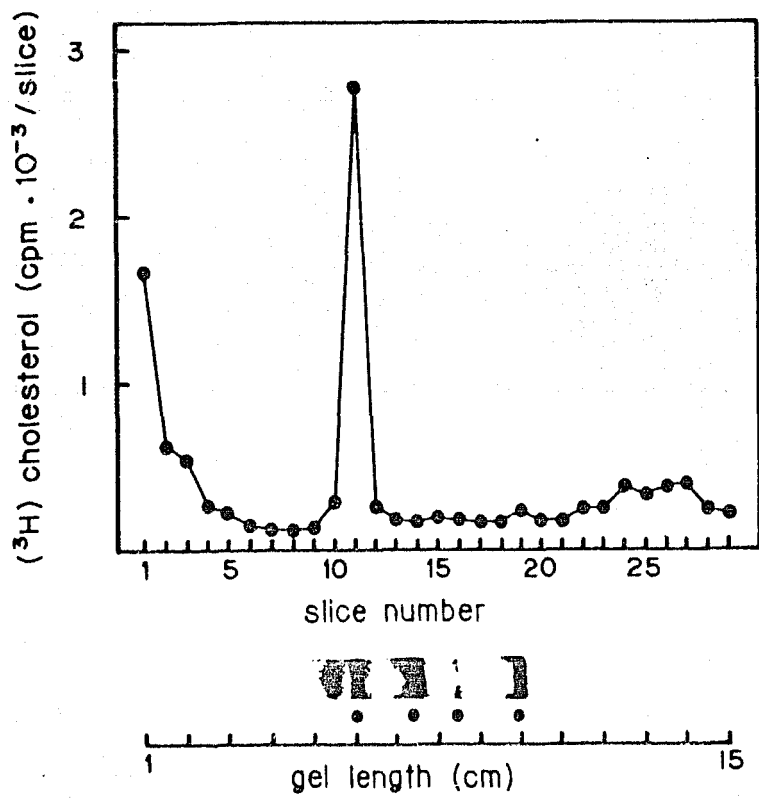


Fig. 2

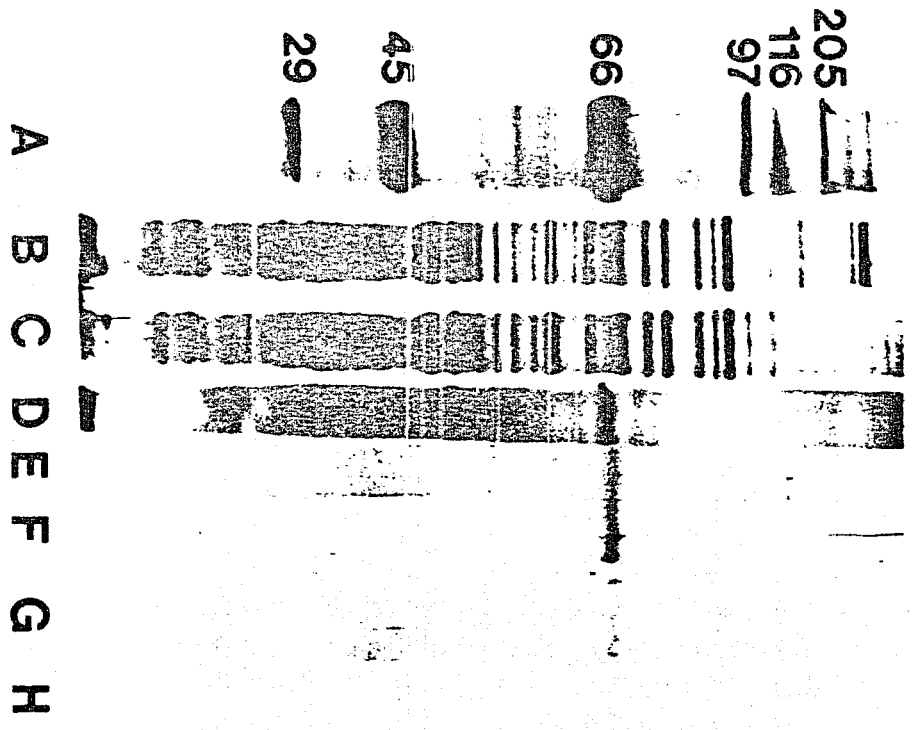


Fig. 3

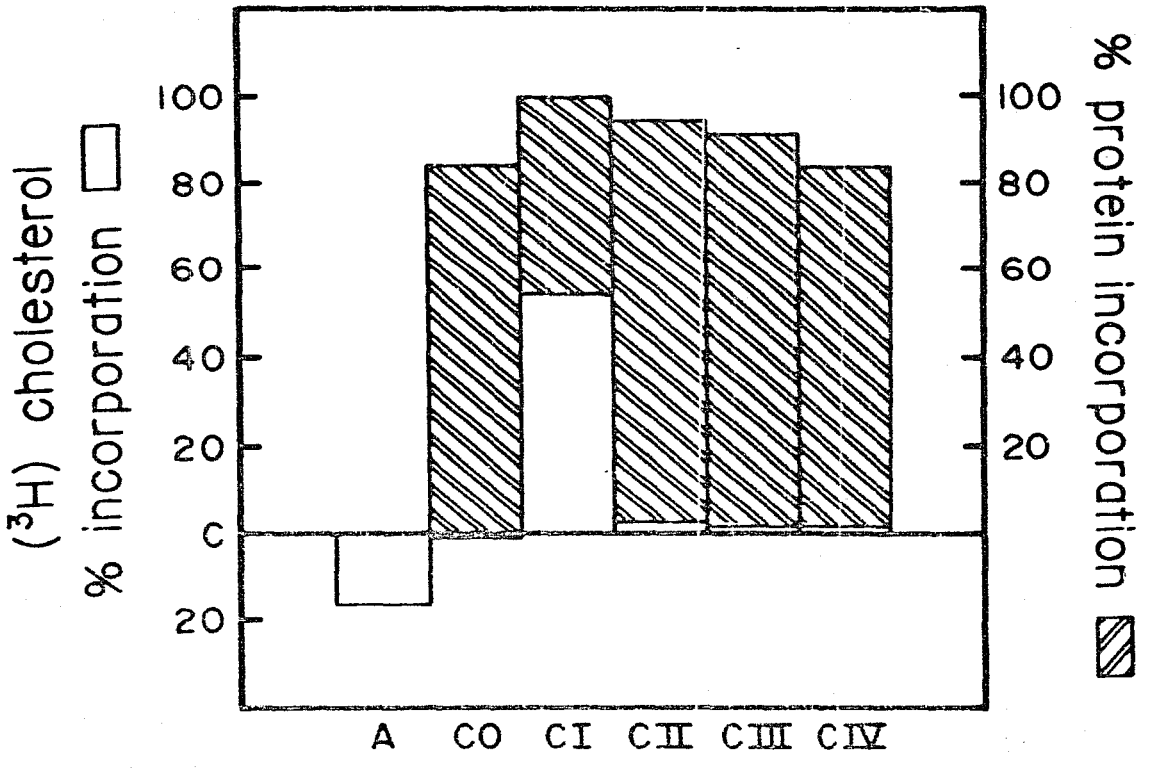


Fig. 4