

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## PROTEINAS TRANSFERIDAS DE COLESTEROL DE MEMBRANA PLASMATICA



T E S I S EXAMENES PROFESIONALES  
IAC. DE QUIMICA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

MONICA RUIZ NORIEGA

MEXICO, D.F. 1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **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.

Jurado asignado:

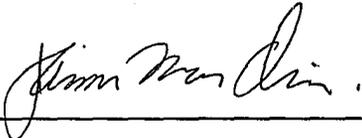
Presidente: Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos  
Vocal: Dr. Jaime Mas Oliva  
Secretario: Dra. Marina Gavilanes Ruíz  
1<sup>er</sup> Suplente: Dra. Martha Robles Flores  
2<sup>do</sup> Suplente: Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Bioenergética.  
Instituto de Fisiología Celular.  
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

Dr. Jaime Mas Oliva.



---

Sustentante:

Mónica Ruiz Noriega



---

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes incondicionalmente siempre me han apoyado y motivado y de quienes espero algún día tener un poquito de lo mucho que tienen ellos como seres humanos.

A todos mis hermanos: Juan Mariano, Tomás, Fernando, la Nena, Luis Manuel, Marisa, Pablo, Eduardo, Pedro y Constanza, los cuales cada uno a su manera han contribuido a que haya podido llegar hasta donde he llegado ahora.

A todos mis amigos los cuales forman la parte más rica de todo lo que me llevo de esta etapa de mi vida.

Agradezco sinceramente al Dr. Jaime Mas Oliva quien dirigió y revisó este trabajo, por su constante apoyo y estímulo, y muy especialmente por todo lo que de él he aprendido además de la bioquímica.

A Blanca Delgado por su enorme paciencia; sin su ayuda éste trabajo no habría sido posible.

Al Dr. Alejandro Zentella por sus sugerencias y valiosísima ayuda en la sección de Biología Molecular.

A Adela Castillejos por su ayuda en todo momento.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de algún modo u otro me ayudaron a alcanzar esta meta.

# CONTENIDO

1.	INTRODUCCION	1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3.	MATERIALES Y METODOS	21
4.	RESULTADOS	44
5.	DISCUSION	56
6.	CONCLUSIONES	61
7.	ANEXO I	62
8.	BIBLIOGRAFIA	72

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 Lipoproteínas plasmáticas

Los lípidos, moléculas insolubles en agua, se transportan en el plasma en forma de complejos macromoleculares llamados lipoproteínas. Estas moléculas son partículas globulares de elevado peso molecular constituidas principalmente por triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos.

Cada una de estas moléculas contiene un núcleo no polar que constituye la mayor parte de la masa de la partícula, y el cual está formado principalmente por triglicéridos y ésteres de colesterol en concentraciones variables dependiendo de la lipoproteína que se trate. Alrededor de este núcleo existe una capa superficial de lípidos polares (como fosfolípidos y colesterol no esterificado), que estabilizan a la partícula de lipoproteína de modo que pueda permanecer en solución en el plasma. Cada partícula de lipoproteína contiene también proteínas específicas localizadas en su superficie, denominadas apoproteínas o apolipoproteínas (Figura 1)<sup>(1)</sup>.

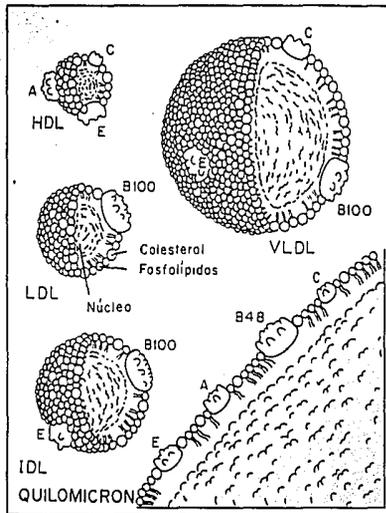


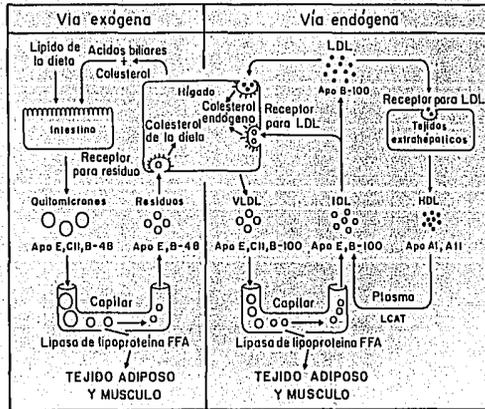
Figura 1. Diagrama esquemático de las principales lipoproteínas plasmáticas.

TABLA I Características de las principales lipoproteínas del plasma humano.<sup>(1)</sup>

Clase de lipoproteína y densidad (g/ml)	Lípidos más importantes	Apoproteínas	Origen	Funciones principales	Diámetro (Å)
Quilomicrones (d<0.95)	Triglicéridos de la dieta	AI, AII, B48, CIII, E	Intestino delgado	Transportan triglicéridos y colesterol del intestino al plasma.	800-500
Remanentes de Quilomicrones (d<0.95)	Colesterol y triglicéridos	B48, E	Derivan de la lipólisis de quilomicrones por LPL	Transportan colesterol y triglicéridos al hígado.	
VLDL (d<1.006)	Triglicéridos endógenos	B100, CI, CII, E	Hígado	Transportan triglicéridos a diferentes tejidos.	300-800
IDL (d=1.006-1.019)	Esteres de colesterol y triglicéridos	B100, E	Derivan de la lipólisis de VLDL por LPL	Algunas son precursoras de LDL; otras proveen colesterol al hígado.	
LDL (d=1.019-1.063)	Esteres de colesterol	B100	Derivan de la lipólisis de IDL por LPL	Proveen colesterol a diferentes tejidos.	50-350
HDL (d=1.063-1.21)	Esteres de colesterol y fosfolípidos	AI, AII	Derivados de la hidrólisis de quilomicrones y VLDL y de la síntesis de novo del hígado e intestino.	Facilitan la remoción de colesterol de tejidos extrahepáticos para transportarlos al hígado.	50-120

Abreviaciones: VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LPL, lipasa lipoproteica.

Existen 6 clases principales de lipoproteínas que se diferencian entre sí tanto en la composición de los lípidos no polares del núcleo y el tipo de apoproteína, como en su densidad, tamaño, movilidad electroforética, etc (Tabla 1)<sup>(1)</sup>. Las vías de formación de lipoproteínas, su interconversión y su metabolismo en el organismo, son procesos de enorme complejidad y precisión, por lo que nos limitamos a dar una descripción de ellos a grandes rasgos en la Figura 2<sup>(2)</sup>. En las células epiteliales del intestino, los triglicéridos y el colesterol de la dieta se incorporan en



**Figura 2.** Vías de formación y catabolismo de las lipoproteínas. 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.

grandes partículas de lipoproteína denominadas quilomicrones, los cuales son secretados hacia la linfa intestinal y pasan a la circulación general, donde se adhieren a las paredes capilares. Unidos a estas superficies endoteliales, quedan expuestos a una enzima localizada en la superficie del endotelio vascular: la lipasa de lipoproteína (LPL), la cual se activa por la apoproteína CII que contienen los quilomicrones, promoviendo la secreción de ácidos grasos libres y monoglicéridos. Una vez que se han eliminado los triglicéridos del núcleo, el resto del quilomión se disocia del endotelio capilar y vuelve a la circulación. Ahora se ha transformado en una partícula relativamente pobre en triglicéridos, enriquecida en ésteres de colesterol, y ha experimentado un intercambio de apoproteínas con otras lipoproteínas del plasma. El resultado neto es la conversión del quilomión en una partícula remanente de quilomión, enriquecida en ésteres de colesterol y en apolipoproteínas B48 y E (Figura 3)<sup>(1)</sup>. Este remanente

Quilomicrones

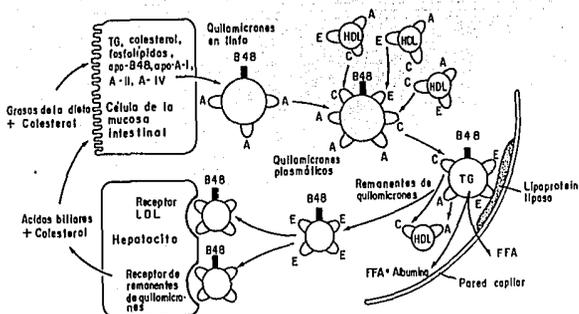


Figura 3. Síntesis y catabolismo de lipoproteínas derivadas del intestino. (Ver texto)

para al hígado, donde es captado con gran eficacia por medio de la fijación de la apoproteína E a receptores específicos ubicados en la superficie de los hepatocitos. Estos remanentes unidos a la superficie son captados en el interior de la célula donde los lisosomas los desintegran por un proceso llamado endocitosis mediada por receptor<sup>(4)</sup> (Figura 4)<sup>(2)</sup>.

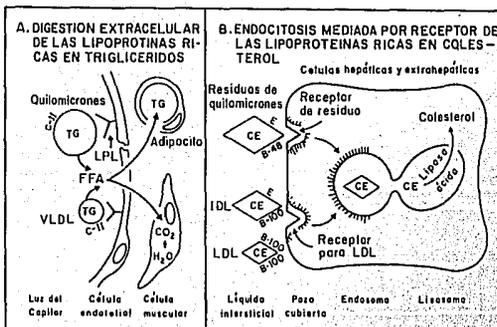


Figura 4. Mecanismos por los cuales las lipoproteínas ricas en triglicéridos y ricas en colesterol liberan sus lípidos a los tejidos blanco.

La síntesis de triglicéridos en el hígado se intensifica cuando la dieta contiene hidratos de carbono en exceso. El hígado convierte esos hidratos de carbono en ácidos grasos, los esterifica con glicerol para formar triglicéridos, y secreta estos últimos hacia la corriente sanguínea en el núcleo de la lipoproteína de muy baja

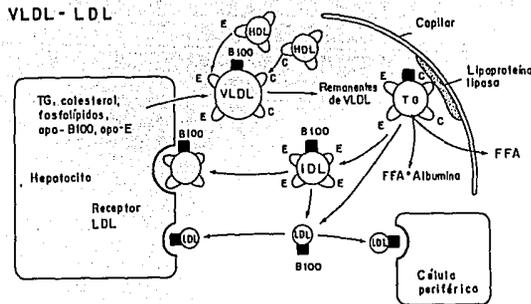


Figura 5. Síntesis y catabolismo de las lipoproteínas derivadas del hígado (ver texto).

densidad (VLDL) (Figura 5)<sup>(1)</sup>. Las partículas de VLDL son transportadas hacia los capilares de los tejidos, donde interactúan con la misma lipasa de lipoproteína (LPL) que cataboliza a los quilomicrones. Los triglicéridos del núcleo de VLDL son hidrolizados y los ácidos grasos se utilizan para síntesis de triglicéridos dentro del tejido adiposo. Los remanentes originados de la acción de la lipasa sobre la VLDL se llaman lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Una porción de las partículas de IDL son catabolizadas por el hígado uniéndose a receptores diferentes de los receptores de los remanentes de quilomicrones; el resto de la IDL permanece en el plasma, donde experimenta una transformación adicional en la que se suprimen casi todos los triglicéridos residuales. Durante esta conversión, todas las apolipoproteínas son extraídas de la partícula con excepción de la apolipoproteína B100. El resultado es la transformación de la partícula de IDL en una lipoproteína de baja densidad (LDL) rica en colesterol. El núcleo de LDL se compone casi enteramente de ésteres de colesterol, y la capa superficial contiene una sola apolipoproteína, la apo B100 (Figura 5)<sup>(1)</sup>.

Una de las funciones de LDL es suministrar colesterol a diversas células parenquimatosas extrahepáticas, como las de la corteza suprarrenal, linfocitos, músculo y riñón, las cuales tienen receptores de LDL ubicados en su superficie celular. La concentración de estas lipoproteínas en plasma está correlacionada con la propensión a enfermedades coronarias, como la aterosclerosis. La LDL que se une a este receptor, es incorporada a la célula por una endocitosis mediada por receptor y es digerida por lisosomas intracelulares (Figura 4)<sup>(2)</sup>.

Los ésteres de colesterol de LDL se hidrolizan por acción de una lipasa ácida, y el colesterol liberado se utiliza para la síntesis de membrana y como precursor en la síntesis de las hormonas esteroides. Como los tejidos extrahepáticos, el hígado también tiene receptores para la LDL; utiliza el colesterol unido a LDL para la síntesis de ácidos biliares y para producir colesterol libre, que se secreta hacia la bilis.

Como las membranas de las células parenquimatosas experimentan recambio a medida que las células mueren y se renuevan, este colesterol no esterificado se libera hacia el plasma donde se une inicialmente a las **lipoproteínas de alta densidad (HDL)**. La concentración de las HDL es inversamente proporcional al riesgo de desarrollar aterosclerosis ya que estas lipoproteínas promueven la salida de colesterol de las células. Este colesterol no esterificado se une entonces a un ácido graso por una reacción de transesterificación catalizada por la enzima plasmática lecitíncolesterol acil transferasa (LCAT). Los ésteres de colesterol que se forman en la superficie de HDL se transfieren a VLDL, y finalmente aparecen en LDL puesto que estas últimas derivan de las VLDL. Esto establece un ciclo a través del cual LDL transporta colesterol a las células extrahepáticas, regresando al hígado vía HDL.

## **1.2 Proteínas transferidoras de lípidos**

La composición de las lipoproteínas plasmáticas se ve continuamente modificada durante su metabolismo intravascular, como resultado del intercambio dinámico y la transferencia neta de lípidos que existe entre ellas. Evidencia reciente muestra que la transferencia y el intercambio de lípidos entre las lipoproteínas es regulada por proteínas especializadas que realizan estas funciones.

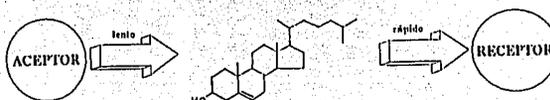
Estas proteínas plasmáticas facilitan la transferencia e intercambio neto tanto de lípidos neutros (ésteres de colesterol y triglicéridos), como de fosfolípidos entre las lipoproteínas,<sup>(5-11)</sup> aunque también existe movimiento espontáneo o no facilitado, de lípidos.

### *1.2.1 Mecanismos de transferencia no facilitada de lípidos*

El intercambio o transferencia de ésteres de colesterol y fosfolípidos entre lipoproteínas plasmáticas, es catalizado

por proteínas intercambiadoras, mientras que los mecanismos de movimiento de colesterol libre entre partículas no se han establecido aún.

Se ha demostrado que el recambio espontáneo de colesterol en el plasma y en eritrocitos, reportado por primera vez por Hagerman y Gould<sup>(12)</sup>, ocurre en una gran variedad de membranas biológicas, lipoproteínas y liposomas. Aunque el recambio de colesterol está bien documentado, el mecanismo para este proceso no ha sido hasta la fecha debidamente establecido. Al respecto se han propuesto dos posibilidades: el primer mecanismo, propuesto inicialmente por Hagerman y Gould<sup>(12)</sup>, propone la transferencia o recambio de colesterol libre por difusión a través de una fase acuosa; el colesterol o fosfolípidos se desprenden de la vesícula o partícula donadora y quedan "solubles" en la fase acuosa. El desprendimiento del lípido de la partícula donadora parece ser el paso limitante, después del cual difunde en la fase acuosa hasta alcanzar la partícula aceptora mediante un proceso totalmente aleatorio<sup>(13)</sup>. Una vez que el lípido ha interactuado con la partícula aceptora, éste se absorbe rápidamente (Figura 6)<sup>(13)</sup>.



**Figura 6.** Mecanismo de intercambio y transferencia de colesterol entre liposomas. El desprendimiento del lípido de la partícula donadora y su liberación a la fase acuosa parece ser el paso limitante; el lípido liberado choca con la partícula aceptora y se absorbe rápidamente.

La transferencia de masa neta ocurre únicamente cuando la actividad lipídica en las partículas donadoras es mucho mayor que la actividad en las partículasceptoras; es decir, cuando la concentración del lípido que se va a transferir es mayor en las partículas donadoras que en lasceptoras, se crea un gradiente de concentración que facilita la transferencia del lípido.

Un segundo mecanismo propuesto inicialmente por Gurd<sup>(12)</sup> sugiere que el recambio de colesterol entre las membranas tiene lugar después de un contacto directo entre éstas. Esta última propuesta que también se aplica

al recambio de fosfolípidos, está basada solamente en la observación de que el colesterol y los fosfolípidos son esencialmente insolubles en agua.

Actualmente no existe un acuerdo general sobre cual de los dos mecanismos es el que opera en la transferencia de colesterol y otros lípidos, ya que hay evidencias que sostienen ambas posibilidades<sup>(12,14)</sup> (Anexo I).

Trabajos recientes realizados por McLean & Phillips, han demostrado que el intercambio o transferencia de moléculas de [<sup>14</sup>C]-colesterol entre vesículas unilamelares pequeñas y células se lleva a cabo mediante difusión de estas moléculas a través de la fase acuosa<sup>(13)</sup>.

La cinética de recambio o transferencia de colesterol en vesículas unilamelares pequeñas tiene las siguientes características<sup>(15)</sup>:

1) la velocidad de recambio de colesterol es de primer orden con respecto a la concentración de colesterol libre en la partícula donadora; 2) existe transferencia de aproximadamente 5 moléculas de colesterol por cada molécula de fosfatidilcolina, debido a que el primero es más soluble en agua que el segundo; 3) el proceso de recambio es dependiente de la temperatura; se ha determinado experimentalmente una energía de activación ( $\Delta G$ ) aproximadamente de 70 KJ/mol, asociada al desprendimiento del colesterol de la partícula donadora hacia la fase acuosa; y 4) el empleo de liposomas con una alta relación liposomas aceptores/liposomas donadores, nos muestra que la velocidad de recambio es de orden cero con respecto a la concentración de liposomas aceptores.

Estos cuatro criterios cinéticos pueden utilizarse para evaluar el mecanismo de intercambio de colesterol entre cualquier tipo de partículas donadoras yceptoras.

Experimentos recientes donde los liposomas donadores y receptores fueron separados por una membrana de diálisis, han demostrado que cierto porcentaje de colesterol marcado radioactivamente es capaz de difundir a través de la membrana<sup>(12,13,17)</sup>. En estos trabajos también se menciona que la difusión de los lípidos puede aumentar con la adición de etanol<sup>(16)</sup>, acetona o dimetilsulfóxido<sup>(17)</sup>, ya que éstos aumentan la solubilidad del colesterol en la fase acuosa, y con ello su transferencia. Estos resultados junto con las cuatro características antes mencionadas, han demostrado que no ocurre fusión entre vesículas durante la transferencia de colesterol, y son consistentes con un mecanismo que involucra la difusión de moléculas de colesterol en fase acuosa, y no la formación de un complejo

entre las partículas involucradas en la transferencia.

Se ha establecido que tanto en liposomas como en las HDL y LDL de humano, la localización y movimiento de moléculas de colesterol libre son similares<sup>(18-20)</sup>. Esencialmente todas las moléculas de colesterol libre en los liposomas unilamelares, así como en las HDL y LDL están en una poza de recambio. En trabajos similares, se ha encontrado que más del 90% de [<sup>14</sup>C]-colesterol libre incorporado en las HDL se transfiere a las LDL, en un proceso de primer orden con respecto a la concentración del colesterol en la partícula donadora, cuyo tiempo de vida media es de 2.9 min aproximadamente, a 37°C<sup>(4)</sup>.

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 de colesterol libre de las HDL<sup>(15)</sup>. Por tanto, 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 de colesterol. Al aumentar la insaturación de los fosfolípidos, se favorece el flujo de colesterol, mientras que al incrementar la concentración de esfingomiélinea, esta velocidad de recambio disminuye<sup>(14)</sup>. Adicionalmente se ha encontrado que la superficie de las LDL de humano es rica en fosfatidilcolina y esfingomiélinea, comparada con las HDL, por lo que el flujo de colesterol más bajo observado en las LDL puede deberse a la mayor cohesión entre el colesterol y los fosfolípidos de la superficie, lo que aumentaría la energía requerida para la liberación del colesterol<sup>(14)</sup>.

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. Sin embargo, en condiciones adecuadas de cultivo se puede lograr un flujo 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<sup>(21)</sup>, en las que se emplearon diferentes complejos de fosfolípidos/apolipoproteínas para remover el colesterol de varias líneas celulares, demuestran que las apolipoproteínas *per se* son pobres receptoras de colesterol libre celular, pero después de complejarlas con varios

fosfolípidos se logra un flujo eficiente de colesterol: al incrementar la concentración de fosfolípidos, aumenta el flujo.

Es importante considerar la distribución de colesterol celular, y al respecto algunos autores han propuesto que en la célula existen dos pozas de colesterol libre que se recambia a diferente velocidad; se considera que hay una poza de recambio rápido, localizada en la membrana plasmática y que constituye el mayor porcentaje (70-95%) del colesterol libre celular<sup>(22)</sup>, y una poza de recambio lento, localizada en las membranas internas, como en el retículo endoplásmico<sup>(14)</sup>.

Por otro lado y de manera interesante, se ha encontrado que el colesterol libre transferido a la membrana plasmática por medio de vesículas donadoras, provoca una regulación negativa de la síntesis de colesterol libre, disminuye la entrada de las LDL e incrementa la esterificación del colesterol libre citoplásmico<sup>(23,24)</sup>.

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 flujo de colesterol es de primer orden con respecto a la concentración de colesterol libre en las células donadoras; se ha calculado una energía de activación de aproximadamente 50 kJ/mol para dicho proceso<sup>(14)</sup>.

El recambio es prácticamente de orden cero con respecto a la concentración de las vesículasceptoras, aunque para ello se requieren relaciones significativamente altas de aceptor/ donador<sup>(25,26)</sup>. Estos datos son muy similares a los obtenidos para el caso de los liposomas, 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 la fase acuosa, hasta que entran en contacto con la partícula aceptoras y son incorporadas por ésta.

Se han reportado<sup>(14,27)</sup> algunos parámetros cinéticos de la salida 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: contenido de colesterol libre, grado de insaturación de fosfolípidos, relación fosfatidilcolina/ esfingomielina, y la interacción del colesterol con las proteínas de la membrana.

### 1.2.2 Mecanismos de transferencia facilitada de lípidos

La primera evidencia de la existencia de proteínas sin actividad enzimática involucradas en el metabolismo lipídico, fue una proteína que se une a los precursores del colesterol insolubles en agua, estimulando su velocidad de conversión al esteroil, conocida como **proteína acarreadora de esteroides (SCP-1)**<sup>(28)</sup>. Esta proteína fue purificada de la fracción soluble del citoplasma de hígado de rata, y es una proteína altamente termosensible que participa específicamente en la conversión del escualeno a lanosterol<sup>(28)</sup>.

Otra proteína acarreadora de esteroides es la llamada **proteína inespecífica transferidora de lípidos (ns-LTP)** también conocida como **proteína acarreadora de esteroides (SCP-2)**<sup>(29)</sup>.

SCP-2 es una proteína de 14 kDa que se ha aislado del citoplasma del hígado de diferentes especies; esta proteína estimula la conversión enzimática de lanosterol a colesterol durante la biosíntesis de colesterol e incrementa la síntesis de ácidos biliares<sup>(29)</sup>. A su vez, tiene la propiedad de estimular la transferencia intermembranal de una gran variedad de lípidos como colesterol, fosfolípidos, esfingomielina, gangliósidos y glicosfosfolípidos neutros<sup>(30)</sup>.

SCP-2 *in vitro* cataliza la transferencia de colesterol de liposomas hacia la mitocondria, facilita la transferencia de una gran cantidad de fosfolípidos, y afecta a diferentes enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides (como A-CAT, 7-hidroxicolesterol oxidasa y a las involucradas en la conversión del lanosterol al colesterol).

El plasma de conejo, libre de lipoproteínas, contiene una proteína capaz de transferir [<sup>3</sup>H]triacilglicerol entre lipoproteínas<sup>(31)</sup> y se conoce como **proteína transferidora de triglicéridos**. Esta es una glicoproteína, con un peso molecular de aproximadamente 100-115 kDa y un punto isoeléctrico de 8-9. Esta proteína es diferente a la proteína que transfiere ésteres de colesterol también aislada de conejo, con un peso molecular de 99 kDa y un punto isoeléctrico de 5.2<sup>(32)</sup>.

Existen en diferentes especies proteínas involucradas en el transporte y transferencia de ácidos grasos (FABPs); algunas de ellas han sido aisladas de hígado, intestino, tejido adiposo y corazón de rata. Son proteínas con un peso molecular aproximado de 40 kDa y un punto isoeléctrico de 9.0. Están localizadas en la región externa de la membrana y desempeñan un papel muy importante en la transferencia de ácidos grasos entre sistemas membranales<sup>(33)</sup>.

Se piensa que estas proteínas juegan un papel muy importante en la captura y transporte de ácidos grasos y en la regulación de la concentración de estos compuestos y de algunos de sus ésteres en la célula<sup>(33)</sup>.

Los ensayos realizados con plasma humano en condiciones fisiológicas, demostraron una transferencia neta de triglicéridos de VLDL y LDL a HDL, con una transferencia recíproca de ésteres de colesterol de HDL a LDL y VLDL<sup>(34)</sup>. Inicialmente, la transferencia de los ésteres de colesterol y triglicéridos se adjudicó a la apoD<sup>(34,35)</sup>; sin embargo, estudios subsecuentes mostraron que al poner en contacto suero con anticuerpos anti-apoD la capacidad de transferencia de ésteres de colesterol no desaparece, descartando la posibilidad de ser apoD una proteína plasmática capaz de llevar a cabo este mecanismo.

Recientemente se han obtenido preparaciones de proteínas a partir de plasma humano, en las cuales se observa un incremento en la actividad específica de transferencia de colesterol de 10 a 15,000 veces, y en las que se obtienen fracciones puras que contienen una o más bandas de proteína de peso molecular aproximado de 60 a 70 kDa en geles con SDS. Una de estas proteínas es la **proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP)**, la cual facilita la transferencia e intercambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre las lipoproteínas<sup>(6)</sup>. Es una glicoproteína, rica en aminoácidos hidrofóbicos (principalmente leucina), con un peso molecular de 74 kDa y un punto isoeléctrico de 5.2.

CETP se considera la proteína plasmática más importante involucrada en el transporte e intercambio de ésteres de colesterol.

Morton y Zilversmith<sup>(35)</sup> muestran que CETP altamente purificada promueve el intercambio y la transferencia neta de triglicéridos y colesterol esterificado, dando como resultado un intercambio recíproco de triglicéridos y colesterol entre las lipoproteínas. Estudios recientes sugieren que CETP puede influir en la transferencia de ésteres de colesterol no sólo entre lipoproteínas sino también entre lipoproteínas y células.

La transferencia de ésteres de colesterol de HDL mediada por CETP se lleva a cabo preferentemente hacia partículas con la relación más baja de triglicéridos/ésteres de colesterol, por ejemplo VLDL o quilomicrones, e incluso LDL<sup>(36-39)</sup>. Dado que la actividad de L-CAT aumenta la relación éster de colesterol/triglicérido en las HDL, la transferencia neta de ésteres de colesterol de HDL a VLDL es más pronunciada si L-CAT se encuentra

presente. Por lo tanto, L-CAT modifica la transferencia de ésteres de colesterol no mediante un efecto directo sobre CETP, sino lo modifica como resultado de las alteraciones que provoca en la composición lipídica de las lipoproteínas.

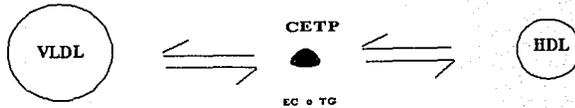
La actividad de L-CAT crea un gradiente en la concentración de colesterol entre los tejidos y los componentes de la sangre (glóbulos rojos y lipoproteínas), llevando el flujo de colesterol hacia la sangre. Bajo la influencia de CETP, los ésteres de colesterol sintetizados por L-CAT, son redistribuidos hacia las lipoproteínas ricas en triglicéridos y eventualmente hacia las LDL, puesto que estas últimas derivan de las VLDL. Dado que existen receptores hepáticos específicos para VLDL y LDL, la redistribución de los ésteres de colesterol via CETP, proveen un mecanismo para la transferencia de ésteres de colesterol derivados de L-CAT del plasma hacia el hígado. Entonces, la transferencia de ésteres de colesterol mediada por CETP en el plasma, constituye un mecanismo muy importante en el transporte de colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado.

Para determinar si los cambios en la composición lipídica de las lipoproteínas afectan también el proceso fisiológico de la transferencia de lípidos, se ha estudiado la distribución y actividad de CETP. Tanto el aumento en la cantidad de esta proteína en plasma, como el de su unión a las lipoproteínas, estimulan el intercambio de lípidos mediado por CETP. El incremento en el intercambio total de ésteres de colesterol de HDL, combinado con el incremento en la relación triglicéridos/ésteres de colesterol en la lipoproteína aceptora, produce un intercambio neto mucho mayor de ésteres de colesterol hacia las lipoproteínas ricas en triglicéridos.

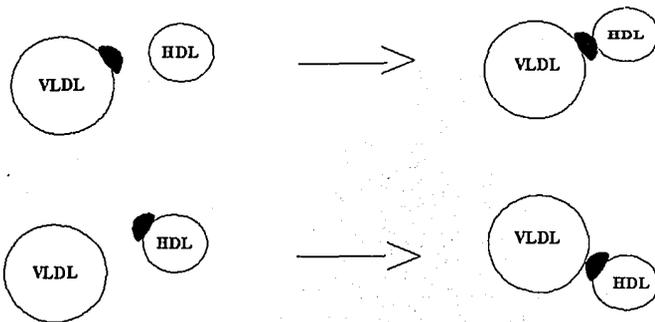
La lipólisis *in vivo* e *in vitro* lleva a alteraciones en la composición de las lipoproteínas, la cual provoca un incremento en la unión de CETP a las lipoproteínas. Este incremento está asociado con el aumento en la transferencia de ésteres de colesterol.

Basados en estudios cinéticos se han propuesto dos mecanismos diferentes para explicar la transferencia de ésteres de colesterol dependientes de CETP. Uno de ellos, propone que CETP actúa como acarreador de ésteres de colesterol entre las partículas donadora y aceptora (ping-pong). (Figura 7a).

El otro mecanismo sugiere la formación de un complejo terciario que involucra tanto a las partículas aceptora y receptora, como a CETP (Figura 7b).



**Figura 7a.** Modelo "ping-pong". CESTP acarrea una o más moléculas de TG o EC desde la lipoproteína donadora hacia la aceptora. CESTP intercambia la molécula lipídica con alguna lipoproteína después de haberse unido a su superficie.



**Figura 7b.** Formación del complejo terciario, que involucra a CESTP y a ambas lipoproteínas. La transferencia se lleva a cabo cuando CESTP se encuentra unida a alguna de las lipoproteínas, previo a la transferencia del lípido. CESTP intercambia la molécula lipídica con alguna lipoproteína después de haberse unido a su superficie.

La unión de esta proteína a las lipoproteínas, que parece ser de carácter electrostático, se efectúa por medio de los grupos fosfato de los fosfolípidos presentes en la molécula de lipoproteína, que son en última instancia los responsables de su interacción con CESTP<sup>(40)</sup>.

La formación de este complejo se favorece si CESTP se encuentra unida a la partícula aceptora o donadora previo a la formación del complejo<sup>(40)</sup> (Figura 7b), y CESTP actúa facilitando la transferencia de lípidos directamente entre las partículas involucradas, y no como acarreador.

Por otro lado, se ha estudiado también la transferencia de ésteres de colesterol mediada por CESTP entre membranas artificiales<sup>(40)</sup>. Estos estudios muestran que CESTP forma un complejo terciario bastante estable con

liposomas de fosfatidilcolina, con o sin otros lípidos, de la misma manera que lo hace con las lipoproteínas y que además, existe transferencia de lípidos una vez que se formó el complejo<sup>(16)</sup>.

La fracción plasmática libre de lipoproteínas de diferentes especies, incluyendo aquellas con o sin actividad importante en la transferencia de ésteres de colesterol, contiene inhibidores de CETP. Un inhibidor de la transferencia de ésteres de colesterol y triglicéridos con un peso molecular aproximado de 32 kDa, se purificó de plasma humano. ApoA, apoE y albúmina libre de ácidos grasos, inhiben también la transferencia al disminuir los sitios de unión de CETP a la superficie de la lipoproteína<sup>(41)</sup>. Estas proteínas probablemente compiten por el sitio de unión de CETP a la superficie de la lipoproteína o lo modifican.

Se ha logrado clonar CETP a partir de DNA de hígado de humano<sup>(51)</sup> y se ha determinado la estructura de su gen<sup>(52)</sup>; éste, que existe como una sola copia, consta de 16 exones y abarca aproximadamente 25 kbp del DNA genómico<sup>(52)</sup>.

En el humano, las principales fuentes de RNA mensajero (mRNA) de CETP son el hígado, el bazo y el tejido adiposo; en menores cantidades se encuentra en intestino delgado, adrenales, riñón y corazón<sup>(51)</sup>. De igual manera, se ha encontrado que una gran variedad de tipos celulares secretan CETP o contienen mRNA para CETP<sup>(51,54-59)</sup>. De manera interesante, al clonar el cDNA de CETP de tejido adiposo, se encontró una variante nueva de mRNA de CETP, en la cual el exón 8 se encuentra unido directamente al exón 10, provocando la formación de una secuencia que no contiene al exón 9<sup>(60)</sup>.

La ausencia del exón 9 provoca la remoción de 60 aminoácidos de la secuencia completa de CETP, sin alterar el marco de lectura de traducción de la secuencia. La expresión de este cDNA, en el cual no se encuentra el exón 9, provoca la síntesis de una proteína más pequeña que no se encuentra en plasma (a diferencia de la que se obtiene del cDNA de CETP con los 16 exones), pero que se encuentra presente en homogenados de diferentes tejidos humanos<sup>(61)</sup>. La abundancia de esta forma alternativa de edición del RNA varía desde el 20% del RNA total de CETP en hígado, hasta el 40%-60% en bazo<sup>(60)</sup>. Esta forma alternativa de edición del RNA puede ayudar a controlar la cantidad de CETP activa que secretan las células.

La función de las formas alternativas de edición del mRNA se desconoce. En general, puede ser para actuar como

"switch" regulador o para producir isoproteínas que tienen diferentes funciones especializadas en diferentes tejidos y/o en diferentes etapas del desarrollo.

Aunque CETP altamente purificada promueve el intercambio tanto de fosfolípidos como de ésteres de colesterol y triglicéridos<sup>(7,8)</sup>, existe evidencia de que el plasma contiene una proteína distinta que transfiere fosfolípidos (PTP), que media la transferencia de una gran variedad de fosfolípidos incluyendo fosfatidilcolina, esfingomielinina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol, pero no media la transferencia de ésteres de colesterol<sup>(9,10,42,43)</sup>. PTP inicialmente caracterizada por su habilidad para aumentar la transferencia de fosfolípidos de liposomas a HDL<sup>(11,44)</sup> fue purificada de la fracción plasmática  $d > 1.21$  g/ml y se le determinó un peso molecular aproximado de 41 kDa.

PTP puede aumentar la transferencia neta y el intercambio de fosfolípidos entre lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL) y HDL<sup>(45)</sup>. Esta transferencia es seguida del movimiento de colesterol hacia las HDL desde otras lipoproteínas y células, proveyendo entonces ambos sustratos que requiere la LCAT (fosfolípidos y colesterol). PTP también es capaz de mediar la transferencia neta de fosfolípidos de vesículas a HDL, resultando en la formación de partículas HDL menos densas<sup>(11,44)</sup>.

El mecanismo de intercambio facilitado por PTP a diferencia del intercambio espontáneo de fosfolípidos<sup>(15,20,46,47)</sup> en el que se supone que la molécula de fosfolípido se desprende de la lipoproteína donadora y difunde a la aceptora a través de la fase acuosa dependiendo de la hidrofobicidad de la molécula, parece ser independiente de la hidrofobicidad y debe llevarse a cabo mediante la formación de un complejo que involucra a ambas lipoproteínas y a PTP, similar al que se forma para CETP<sup>(48)</sup>.

Dentro de los antecedentes experimentales que tenemos en el laboratorio, conocemos que la molécula de colesterol de membrana plasmática juega un papel importante en la regulación de las funciones de membrana. Como tales pueden entenderse por ejemplo, tanto transporte activo de  $Ca^{++}$  por la ATPasa ( $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$ ), como la unión de un ligando a un receptor. Estos estudios demuestran que existe relación directa entre la concentración del colesterol en la membrana, y la actividad de ciertas proteínas como la ATPasa/ $(Ca^{2+}$ - $Mg^{2+})$ <sup>(49)</sup>: la actividad de la enzima es inversamente proporcional a la concentración del colesterol en la membrana, mostrando una baja actividad de

ATPasa con concentraciones elevadas de colesterol, y alta actividad cuando la concentración de colesterol es baja. De esta manera, se planteó la existencia de mecanismos de regulación de la concentración de este esteroles en la membrana, donde moléculas intrínsecas de la membrana con afinidad por colesterol, pudieran llevar a cabo este mecanismo.

Así, recientemente en el laboratorio, se aisló una proteína de sarcolema cardíaco de conejo, que puede ser incorporada en liposomas y llevar a cabo la transferencia de colesterol del medio de incubación al liposoma. Por ello se le denominó **proteína transferidora de colesterol (CHTP)**<sup>(50)</sup>. Brevemente, CHTP fue purificada a partir de una fracción sarcolemal de músculo cardíaco obtenida mediante solubilización con Tritón X-100 y centrifugación diferencial, donde inicialmente se obtuvo una mezcla de proteínas que fueron separadas por cromatografía en columna empleando una resina de colesterol hemisuccinato-agarosa. Al eluir esta columna con amortiguadores de diferente fuerza iónica, se obtuvo una fracción de proteínas con alta afinidad por colesterol. Las proteínas contenidas en esta fracción, fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Bajo estas condiciones, se observó que cuatro proteínas migran en estos geles. Estas cuatro bandas se denominaron CI, CII, CIII y CIV.

De manera interesante se encontró que de las cuatro fracciones, únicamente CI, que corresponde a la proteína de mayor peso molecular, fue capaz de unir colesterol estando embebida en el gel. Este resultado por primera vez, sugirió la posibilidad de la presencia de una proteína con afinidad por colesterol contenida en el solubilizado de sarcolema cardíaco.

La movilidad aparente entre las fracciones CI, CII, CIII y CIV, sugirió la posibilidad de contar con una proteína monomérica (que correspondería a CIV), considerando que las fracciones CI, CII y CIII podrían representar multímeros de esta misma proteína. Con base en esta posibilidad, se decidió extraer cada una de las fracciones de los geles nativos y someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. De manera interesante, se observó que las cuatro fracciones corresponden a una misma proteína con un peso molecular de 73 kDa la cual aparentemente puede representar el monómero de CHTP.

Para reforzar estos resultados, se probaron anticuerpos policlonales anti-CI obtenidos de suero de borrego con cada

una de las fracciones CI, CII, CIII y CIV, donde se observó que mediante reacciones de inmunoprecipitación (Western blot) éstos anticuerpos reconocen a las cuatro fracciones. Posteriormente, estas cuatro fracciones fueron reconstituidas en liposomas de fosfatidilcolina/ fosfatidilserina para estudiar la afinidad de cada una de ellas por el colesterol. Se encontró que únicamente la fracción CI reconstituida en liposomas era capaz de incorporar o transferir colesterol del medio de incubación a las membranas artificiales. Las fracciones CII, CIII y CIV, fueron incapaces de incorporar colesterol al estar reconstituidas en membranas artificiales.

Estos resultados nos permitieron concluir que CHTP es una proteína intrínseca de la membrana plasmática del con afinidad por colesterol y capaz de transferir a este lípido al ser la forma multimérica de la proteína reconstituida en liposomas.

Consideramos que CHTP pudiera pertenecer a una superfamilia de proteínas involucradas en el transporte de lípidos entre lipoproteínas o entre membranas naturales y/o artificiales.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente en el laboratorio se aisló una proteína a partir de sarcolema cardíaco de conejo, que al ser incorporada en liposomas, es capaz de llevar a cabo la transferencia de colesterol del medio de incubación a la membrana liposomal, razón por la cual se denominó proteína transferidora de colesterol (CHTP).

Estudios realizados por diversos grupos, han reportado la existencia de varias proteínas que participan en la transferencia de lípidos. Una de estas proteínas, la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), que se encuentra en el plasma sanguíneo, intercambia ésteres de colesterol por triglicéridos entre los diferentes tipos de lipoproteínas. Esta proteína ha sido purificada y caracterizada a partir de plasma humano.

Estas dos proteínas, CHTP y CETP, presentan características similares en cuanto a peso molecular y a la función que llevan a cabo, por lo que en este trabajo, se decidió investigar la posibilidad de que CETP reconstituida en una membrana, pudiera comportarse como CHTP transfiriendo colesterol libre entre partículas lipoproteicas y la membrana, y así pensar en la posibilidad de que estas dos proteínas pudieran ser miembros de una familia de proteínas asociadas a la membrana plasmática, importantes en la regulación de la homeostasis del colesterol.

Para ésto, realizamos experimentos de transferencia de [<sup>14</sup>C]-colesterol entre lipoproteínas de alta densidad y liposomas con CETP reconstituida, para posteriormente cuantificar la cantidad del esteroles remanente en la partícula donadora.

En vista de la reciente clonación y secuenciación de CETP, así como de las similitudes estructurales entre esta molécula y CHTP, se decidió a partir de esta secuencia iniciar la deducción de la secuencia de CHTP.

Ya que existen tejidos que no secretan CETP y tienen la señal para producirla, decidimos iniciar la investigación de si esta señal puede corresponder a proteínas relacionadas que pudieran estar asociadas a la membrana, entre ellas pudiendo incluir a CHTP. Para poder llevarlo a cabo, sintetizamos oligonucleótidos específicos de la secuencia de CETP y amplificamos segmentos de ésta por PCR en tejidos con abundante contenido de CETP (como lo es el hígado, por ejemplo). Una vez que logramos hacerlo, decidimos buscar la señal para CETP en tejidos con un metabolismo del colesterol disminuido o en tejidos que no sintetizan CETP, con la finalidad de iniciar el estudio de si alguna forma alternativa de CETP pudiera corresponder a CHTP. De ser este el caso, en un futuro se estudiará la relación existente entre la estructura de estas proteínas y su capacidad de quedar en la

membrana plasmática o de ser secretadas.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Reactivos y materiales

Bromuro de potasio, cloruro de sodio, acetato de sodio se obtuvieron de MERCK (México).

Tris, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dodecilsulfato de sodio, acrilamida, bis-acrilamida, resina de fenil-sefariosa, resina de concanavalina A-sefariosa, fosfatidilcolina, colesterol, benzamidina, inhibidor de tripsina, 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), heparina (sal sódica), cloruro de manganeso,  $\alpha$ -metil-D-manósido, albúmina sérica bovina, estándares de peso molecular, persulfato de amonio, reactivo Folin-phenol, se obtuvieron de Sigma Chem. Co. (St. Louis MO, USA).

Método colorimétrico para la determinación de colesterol MONOTEST de Boehringer Mannheim (distribuido en México por Farmacéuticos Lakeside).

[<sup>3</sup>H]-colesterol (actividad específica 22.0 Ci/mmol), [<sup>14</sup>C]-colesteril-oleato (actividad específica 55.0 mCi/mmol), y [<sup>32</sup>P]-ATP (gamma) (actividad específica 1000 Ci/mmol) se obtuvieron de New England Nuclear (NEN), Research Products (Boston MA, USA).

El plasma humano fue donación del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Neurología.

Cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, fosfato monobásico de potasio, acetato de sodio, Tris, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dodecilsulfato de sodio (SDS), agarosa, bromuro de etidio, hidróxido de sodio, citrato de sodio, MOPS, etanol, pirofosfato de sodio y DNA de esperma de salmón, se obtuvieron de Sigma Chem. Co. (St. Louis MO, USA), reactivos para biología molecular.

Fenol, formaldehído y alcohol isoamílico, se obtuvieron de ICN Biomedicals, Inc (Cleveland OH, USA); cloroformo se obtuvo de Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, New York, Montreal).

Marcadores de peso molecular (fragmentos lambda Hind III y Phi) se obtuvieron de Boehringer Mannheim.

Membranas de nylon-nitrocelulosa (Nytran) empleadas para transferencias, se obtuvieron de Stratagene.

Kit empleado para el marcaje de oligonucleótidos se obtuvo de Pharmacia y kit de RT-PCR de Perkin Elmer Cetus (Norwalk CT, USA). El termociclador empleado para las reacciones de PCR, también es de Perkin Elmer Cetus.

Método para aislamiento de RNA, RNazoI-B, se obtuvo de Biotex Laboratories, INC (Houston TX, USA).

Películas KODAK (X-OMAT) de 8 X 10 pulgadas para autorradiografía.

Reactivos empleados para la síntesis de oligonucleótidos, así como el sintetizador, se obtuvieron de Applied Biosystems.

## 3.2 Aislamiento de lipoproteínas:

### 3.2.1 Lipoproteínas de baja densidad

A la fracción de plasma inicial deben agregarse: inhibidor de tripsina (0.01%), benzamidina (0.01%), DTNB 1.5mM, estreptomycin (0.1%) y gentamicina (1 vial/unidad de plasma).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL, densidad 1.019-1.063), se obtienen mediante ultracentrifugación diferencial de plasma humano fresco, de acuerdo al método empleado por Havel et al<sup>(61)</sup>, siguiendo las modificaciones de Goldstein y Brown<sup>(62)</sup> (Figura 8).

Inicialmente se ajusta el plasma a una densidad de 1.019 g/ml con KBr de acuerdo a la fórmula de Radding y Steinberg:<sup>(63)</sup>

$$X = V (df - di) / (0.312 \times df)$$

donde X = gramos de KBr, df = densidad final, di = densidad inicial, V = volumen de plasma en mililitros y 0.312 = volumen parcial específico del bromuro de potasio.

Una vez ajustada la densidad del plasma a 1.019, se centrifuga a 49,000 rpm en un rotor 60 Ti durante 16-20 horas a 4°C.

Al término de la corrida, se observan dos fracciones en el tubo: la fracción superior que contiene una mezcla de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL), y la fracción inferior que contiene a las lipoproteínas de baja (LDL) y de alta densidad (HDL), así como plasma libre de lipoproteínas.

La fracción superior se descarta, y la fracción inferior, cuya densidad es de 1.019, se ajusta a una densidad final de 1.063 con KBr de acuerdo a la fórmula anterior, y se centrifuga por 24 horas a 4°C en un rotor 60 Ti a 49,000 rpm. Al terminar este procedimiento, se obtienen dos fracciones: la fracción superior que corresponde a las LDL y la fracción inferior que corresponde a las HDL y al plasma libre de lipoproteínas.

La fracción correspondiente a las LDL se ajusta nuevamente a una densidad de 1.063 (usualmente la densidad es de 1.040) y se vuelve a centrifugar durante 18 horas a 4°C, a 49,000 rpm en un rotor 60 Ti. Esto último se realiza con el objeto de limpiar las lipoproteínas de baja densidad de proteínas contaminantes como albúmina o HDL y para concentrar las LDL.

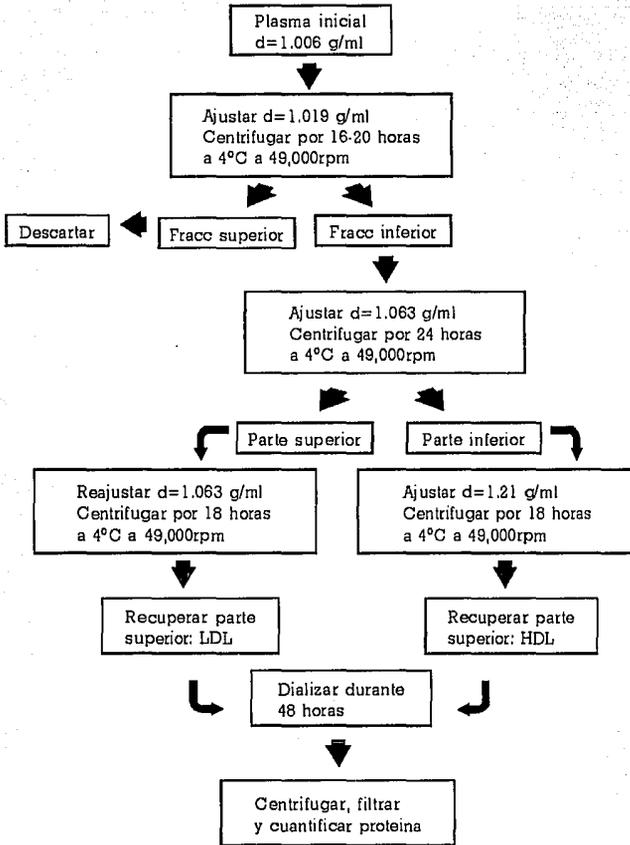


Figura 8. Diagrama de aislamiento de lipoproteínas, LDL y HDL

Se recupera la fracción superior que contiene a las LDL y la fracción inferior se descarta.

La fracción recuperada se dializa en un volumen total de 12 litros de amortiguador NaCl 150mM/ EDTA disódico 0.24mM, pH=7.4 a 4°C (realizando dos cambios de 6 litros cada uno). Una vez terminada la diálisis se centrifugan las LDL a 10,000 rpm a 4°C durante 30 minutos en un rotor Sorvall SS-34, y el sobrenadante obtenido se

esteriliza pasándolo a través de filtros Millipore (0.45 micras). Se determina proteína por el método de Lowry y se ajusta, en caso de ser necesario, a una concentración de 20-40 mg/ml con el mismo amortiguador empleado para la diálisis.

Las lipoproteínas deben guardarse a 4°C y deben usarse en un lapso no mayor a dos semanas.

### 3.2.2 Lipoproteínas de alta densidad

Las lipoproteínas de alta densidad se obtienen ajustando la densidad del plasma a 1.063 g/ml y centrifugando durante 24 horas a 4°C y 49,000 rpm en un rotor 60 Ti. De este procedimiento se obtienen dos fracciones: la fracción superior que contiene lipoproteínas de muy baja densidad, de densidad intermedia y de baja densidad, y la fracción inferior que contiene a las lipoproteínas de alta densidad y plasma libre de lipoproteínas.

Se recupera la fracción inferior y se ajusta a una densidad de 1.21 g/ml.

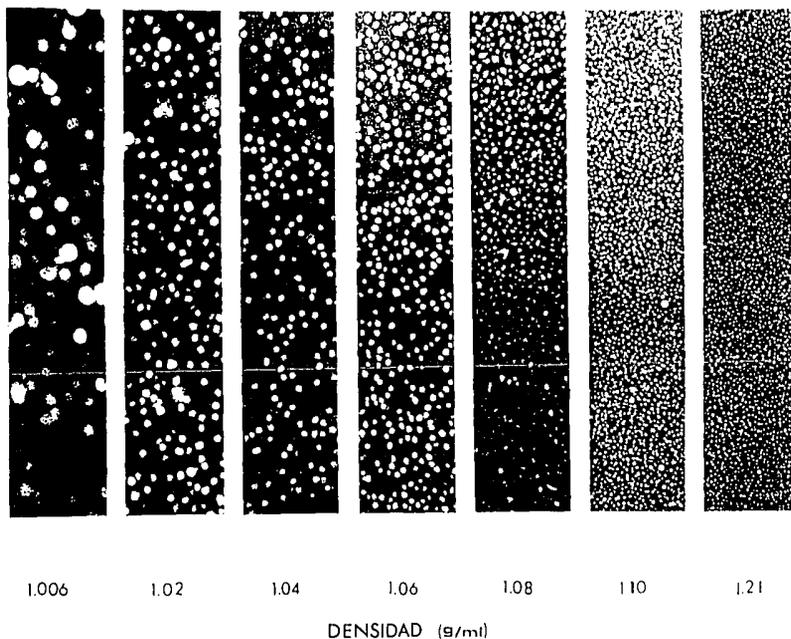
Se centrifuga nuevamente durante 24 horas a 4°C a 49,000 rpm en un rotor 60 Ti, después de lo cual obtenemos dos fracciones: la superior que corresponde a la de las HDL y la inferior que corresponde al plasma libre de lipoproteínas. La fracción superior se recupera y se dializa en el mismo amortiguador que las LDL siguiendo el mismo procedimiento.

Las lipoproteínas empleadas para los ensayos de transferencia de colesterol, obtenidas mediante ultracentrifugación diferencial de plasma humano, se muestran en la **Figura 9**.

## 3.3 Purificación de CETP

A la fracción de plasma inicial deben agregarse: inhibidor de tripsina (0.01%), benzamida (0.01%), DTNB 1.5mM, estreptomina (0.1%) y gentamicina (1 vial/unidad de plasma).

La purificación se realiza de acuerdo al método empleado por Patnaik y colaboradores<sup>(6)</sup>, modificado en nuestro laboratorio, de la siguiente manera (**Figura 10**): Se emplea plasma humano fresco el cual se ajusta a una densidad de 1.21 g/ml con KBr<sup>(6)</sup>. Una vez ajustada la densidad, se centrifuga a 39,000 rpm durante 48 horas en un rotor 45 Ti; al finalizar se obtienen 3 fracciones, de las cuales se recupera la fracción clara intermedia que contiene CETP. Esta fracción se dializa durante 48 horas con 15 litros de amortiguador NaCl 4M / EDTA 2mM/



**Figura 9.** Lipoproteínas obtenidas de plasma humano por ultracentrifugación a las densidades indicadas: Quilomicrones y VLDL (1.006), IDL (1.006-1.02), LDL (1.02-1.06), HDL (1.06-1.21).

Tris 10mM, pH=7.4 realizando dos cambios de 7 litros cada uno, y finalmente se centrifuga a 10,000 rpm durante 20 minutos para eliminar el precipitado que se forma y se recupera el sobrenadante.

### 3.3.1 Cromatografía en columna:

Se lleva a cabo empleando una columna de fenil-sefarosa CL-4B de 2.6 X 40 cm equilibrada con el amortiguador de diálisis.

La fracción de plasma de  $d < 1.21$  g/ml se aplica a la columna y se eluye inicialmente con el amortiguador anterior, posteriormente con NaCl 150mM / EDTA 2mM / Tris 10mM, pH=7.4 y finalmente con agua. Al eluir

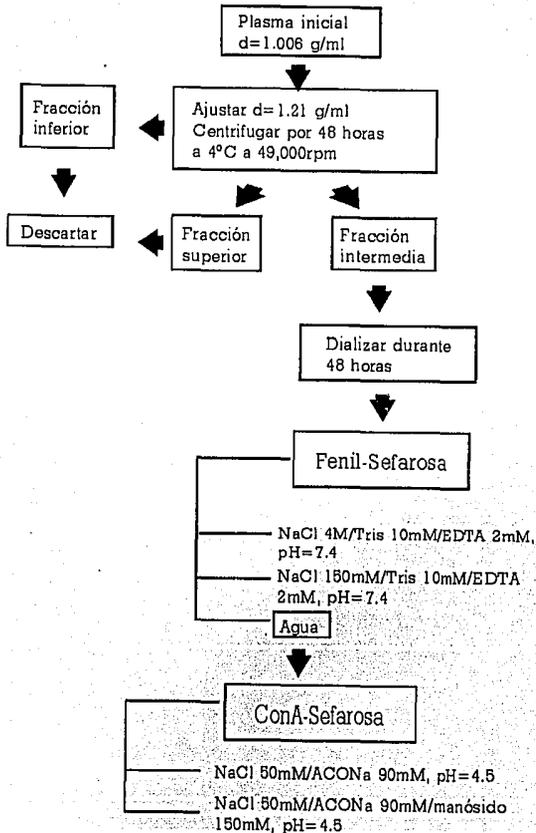


Figura 10. Diagrama de purificación de CETP

con agua, se colectan fracciones de aproximadamente 3 ml a un flujo promedio de 1.5 a 2.0 ml/min. Las fracciones que contienen la fracción de interés se juntan y concentran en una cámara de Amicon empleando membranas YM 50. La columna se regenera lavándola con el amortiguador inicial más azida de sodio al 0.02%. Por último se emplea una columna de concanavalina A-sefarosa de 1.0 X 10 cm equilibrada con acetato de sodio 50mM / cloruro de sodio 90mM, pH=4.5. La fracción de interés obtenida de la columna de fenil-sefarosa se ajusta

a pH=4.5 empleando 1/9 del volumen de la fracción, de 0.5M acetato de sodio, pH=4.5 y se aplica a esta segunda columna.

Se eluye empleando el amortiguador usado para equilibrar y finalmente con el mismo amortiguador adicionando  $\alpha$ -metil-D-manósido 150mM. Se colectan fracciones de aproximadamente 1.0 a 1.5 ml y se juntan las obtenidas al eluir con el segundo amortiguador, las cuales contienen la proteína de interés.

Las fracciones se concentran nuevamente empleando membranas YM 50.

La columna se regenera empleando Tris 50mM /  $\alpha$ -metilmanósido 150mM, pH=7.4, posteriormente agua y finalmente con acetato de sodio 50mM/ cloruro de sodio 90mM, pH=4.5 más azida de sodio al 0.02%. La fracción de CETP obtenida de esta columna al eluir con manósido, se empleó en todos los ensayos de transferencia.

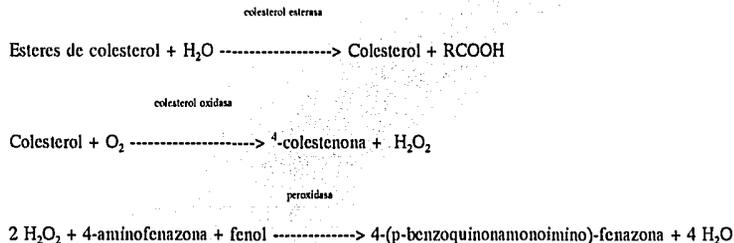
### 3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Las proteínas contenidas en cada una de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna, se separan en geles de poliacrilamida al 7.5% de 140 X 140 X 1.5 mm, que contienen SDS al 1.0%<sup>(64)</sup>. Las condiciones de corrida son de 30 mA de corriente constante y 10°C durante un tiempo aproximado de 4 horas.

Al concluir la corrida, los geles se tiñen con azul de Coomassie.

### 3.5 Cuantificación de colesterol

Se lleva a cabo empleando un método fotocolorimétrico que utiliza el sistema de colesterol oxidasa, el cual consta de 3 enzimas acopladas<sup>(67)</sup>.



Se mide la densidad óptica a 500 nm comparando la absorbencia de las muestras con las obtenidas para los puntos de una curva estándar de colesterol.

Para obtener la concentración de colesterol se realiza un ajuste por el método de mínimos cuadrados.

### **3.6 Cuantificación de proteína**

La cuantificación de la concentración de proteína en las muestras, se realiza empleando el método descrito por Lowry<sup>(66)</sup>.

### **3.7 Preparación de liposomas**

Con el fin de eliminar ácidos grasos libres, 50 g de fosfatidilcolina se lavan con 150 ml de acetona durante toda la noche en agitación, a 4°C. (Se adiciona una o dos gotas de tocoferol como antioxidante).

Posterior a este procedimiento, se decanta la acetona y se adiciona acetona fresca por 1 o 2 horas. Este procedimiento se repite y el sólido se solubiliza con 50 ml de cloroformo. Una vez solubilizado, se evapora el solvente con nitrógeno y se guardan los fosfolípidos a -20°C<sup>(65)</sup>.

La preparación de liposomas se lleva a cabo mezclando fosfatidilcolina y colesterol en una relación 8/2 (peso a peso) respectivamente y se solubiliza en el menor volumen posible de cloroformo. Una vez soluble, se evapora el solvente con nitrógeno y la mezcla se liofiliza durante 6 horas. Se toman 50 mg de la mezcla de fosfatidilcolina/colesterol y se resuspenden en 5 ml de amortiguador NaCl 150mM/Tris 10mM, pH=7.4, para obtener una concentración final de 10 mg/ml.

Una vez resuspendido, la mezcla es sonicada en baño de hielo, con 3 pulsos de 20 segundos y con 20 segundos de descanso entre cada pulso a 30 watts de salida en un sonicador Branson 250.

### **3.8 Incorporación de CETP a liposomas**

Se utilizan 600 µl de liposomas 10 mg/ml y 1 ml de CETP (1mg/ml), para obtener un volumen final de 1.6ml aproximadamente. La mezcla anterior se homogeniza con un agitador tipo Vortex durante 1 minuto y se almacena

a 4°C durante toda la noche. En algunos casos, se emplearon liposomas preparados minutos antes de realizar los ensayos, sin almacenarlos toda la noche a 4°C.

### 3.9 Incorporación de citocromo oxidasa a liposomas

Se utilizan 600µl de liposomas 10mg/ml y 1 ml de proteína (1mg/ml), para obtener un volumen final de 1.6ml aproximadamente. A la mezcla anterior se agrega colato de potasio 0.5% y se sonica en baño de hielo, con 3 pulsos de 20 segundos y con 20 segundos de descanso entre cada pulso a 30 watts de salida en un sonicador Branson 250. La mezcla se dializa durante una o dos horas en un litro de amortiguador NaCl 150mM/Tris 10mM, pH=7.4. Posteriormente se realiza un cambio y se dializa toda la noche a 4°C en un litro del mismo amortiguador.

### 3.10 Preparación de liposomas control

Se utilizan 600µl de liposomas 10mg/ml y se diluyen con 1ml de amortiguador NaCl 150mM/ Tris 10mM, pH=7.4 para tener un volumen final de 1.6ml aproximadamente. La mezcla anterior se homogeniza con un agitador tipo Vortex durante 1 min, y se almacena a 4°C durante toda la noche.

En algunos casos, se emplearon liposomas preparados minutos antes de realizar los ensayos, sin almacenarlos toda la noche a 4°C.

### 3.11 Marcaje de lipoproteínas

Preparación de liposomas.- 50 mg de fosfatidilcolina/colesterol (relación 8/2 respectivamente) se disuelven en la mínima cantidad de cloroformo. Una vez disueltos se añaden 500 µl de marcaje radioactiva, [<sup>14</sup>C]colesteril-oleato o [<sup>3</sup>H]colesterol, dependiendo del tipo de ensayo que se vaya a realizar (ver puntos 3.12 y 3.14).

Se evapora el solvente con nitrógeno y se liofiliza durante 6 horas.

La mezcla liofilizada se resuspende en 5 ml de amortiguador NaCl 150mM/EDTA 0.24mM, pH=7.4 y se sonica en baño de hielo utilizando 3 pulsos de 20 segundos y 20 segundos de descanso entre cada pulso, a 30 watts de salida en un sonicador Branson 250.

Las lipoproteínas aisladas se incuban durante toda la noche a 4°C en agitación constante con liposomas que contienen [<sup>14</sup>C]colesteril-oleato o [<sup>3</sup>H]colesterol. Para separar los liposomas de las lipoproteínas, se centrifuga la mezcla lipoproteínas/liposomas, a 10,000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se emplea para los ensayos de transferencia.

### 3.12 Medición de la actividad de CETP

La lipoproteína donadora, en este caso en particular LDL, contiene ésteres de colesterol marcados radiactivamente, y la transferencia de marca a la partícula aceptora (HDL) se mide al incubarse 3 horas a 37°C con la proteína transferidora de lípidos.

El hecho de elegir como partícula donadora LDL y receptora HDL, se debe a la importancia de la rápida separación de ambas partículas al realizar estudios cinéticos detallados. Esta puede llevarse a cabo provocando la precipitación de las lipoproteínas que contienen apoB (LDL), empleando un catión divalente y un polianión. La actividad de CETP se valora cuantificando la marca transferida a la partícula aceptora, la cual está presente en el sobrenadante.

### 3.13 Precipitación de lipoproteínas con heparina-MnCl<sub>2</sub>:

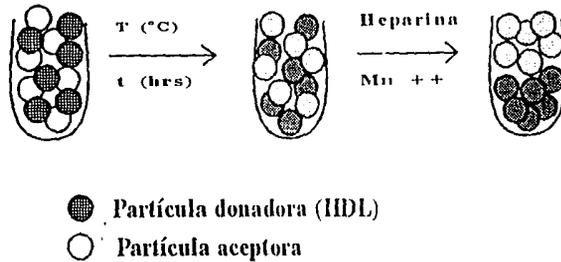
La fracción plasmática que contiene HDL, es usualmente separada por precipitación de las lipoproteínas que contienen apoB (VLDL, IDL, LDL, quilomicrones, β-VLDL) empleando un polianión en combinación con un catión divalente. Las lipoproteínas precipitadas que contienen apoB, son removidas por centrifugación, obteniendo un sobrenadante que contiene HDL. La precipitación de lipoproteínas empleando heparina-MnCl<sub>2</sub> (MnCl<sub>2</sub> 1.0 M, heparina 10<sup>4</sup> unidades/ml de MnCl<sub>2</sub> 1.0 M), se basa en el método de Warnick y Albers<sup>(68)</sup>.

### 3.14 Ensayos de transferencia de colesterol

Para medir la transferencia de colesterol se emplean como partículas donadoras lipoproteínas de alta densidad (HDL) marcadas con [<sup>3</sup>H]colesterol y como partículasceptoras liposomas control y liposomas reconstituidos con

CETP o con citocromo oxidasa, las cuales se separan por precipitación con Heparina-MnCl<sub>2</sub> (Figura 11).

Diferentes concentraciones de proteína incorporada en liposomas (0-100 µg) o diferentes cantidades de lípido, según sea el caso, se incuban con 50 µl de la partícula donadora durante 3 horas a 37°C en un volumen final de 450 µl de NaCl 150mM/Tris 10mM, pH=7.4. Cada punto se realiza por duplicado y con un blanco que contiene únicamente 50 µl de HDL y 400 µl de amortiguador NaCl 150mM/Tris 10mM, pH=7.4, y que se somete al mismo tratamiento que los tubos problema. La reacción se detiene al agregar 50 µl de heparina-MnCl<sub>2</sub> y después de incubarse durante 10 minutos a temperatura ambiente, el precipitado se separa mediante centrifugación (10 minutos, 12,000rpm).



**Figura 11.** Esquema de separación de partículas donadoras yceptoras empleando una solución de Heparina-Mn<sup>++</sup>.

La marca remanente en la partícula donadora, contenida en el sobrenadante, se cuantifica en un contador de centelleo: 400 µl del sobrenadante se añaden a 15 ml de tritosol. La transferencia de colesterol se expresa como porcentaje de radiactividad remanente en el sobrenadante (en las HDL).

### 3.15 Síntesis de oligonucleótidos

Basados en la secuencia de cDNA para CETP obtenido de células de hígado humano<sup>(51)</sup>, se sintetizaron seis pares de oligonucleótidos (Figura 12) tomando en cuenta el patrón de hidropatía de CETP y los sitios de restricción comprendidos en su secuencia. Los oligonucleótidos "sense" (sentido 5'→3') están numerados del 1 al 6 de acuerdo al orden en que fueron sintetizados, y corresponden a los oligonucleótidos 101-106, de igual manera, los



oligonucleótidos "anti-sense" (sentido 3'-->5') corresponden a los oligonucleótidos 201-206. Estos oligonucleótidos se sintetizaron con el fin de amplificar por medio de PCR, secuencias específicas del RNA que codifica para esta proteína o para proteínas similares.

Método de fosforamidita<sup>(69)</sup>: reacción de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida en la que se añade un nucleótido a la vez, a una cadena creciente de oligonucleótidos de la siguiente manera:

- 1.- La dirección en la que se lleva a cabo la síntesis es 5'-->3' y unida a la fase sólida debe encontrarse la primera base de la secuencia del oligonucleótido que se va a sintetizar.
- 2.- Se elimina el dimetoxitriil (DMTr), grupo protector del extremo 5' de la cadena de oligonucleótidos (la cual está anclada a un soporte sólido, generalmente perlas de borosilicato, por su extremo 3') mediante tratamiento con ácido.
- 3.- Una vez que el extremo 5' ha quedado libre, se acopla al derivado de fosforamidita del próximo desoxinucleótido que va a ser unido a la cadena. Este nucleótido debe agregarse en exceso con el extremo 5' protegido para prevenir posible autopolimerización, y activado en su extremo 3' para facilitar la condensación. El agente acoplante es un tetrazoleo.

Cualquier extremo 5' que quede sin acoplarse a este nuevo nucleótido se inactiva por acetilación, para evitar su extensión en reacciones subsiguientes y prevenir la extensión de secuencias erróneas.

- 4.- El grupo triéster fosfita resultante del paso de acoplamiento, se oxida a triéster fosfato.

Esta secuencia de pasos se repite hasta que se ha sintetizado un oligonucleótido con la secuencia deseada; por último, la cadena se separa del soporte sólido y los diferentes grupos protectores, incluyendo los de las bases, se eliminan (Figura 13).

### 3.16 Aislamiento de RNA total

Fundamento: el reactivo comercial empleado, RNazol B (tiocianato de guanidinio, fenol,  $\beta$ -mercaptoetanol), promueve la formación de un complejo del RNA con el guanidinio y con moléculas de agua, evitando interacciones hidrofóbicas con el DNA y proteínas.



El DNA y las proteínas se remueven eficientemente de la solución en la fase orgánica (fenol), mientras que el RNA permanece en la fase acuosa<sup>(70)</sup>. El RNA se recupera por una serie de precipitaciones en etanol y altas concentraciones de sal en condiciones de baja temperatura.

### 3.16.1 Células

1.- Provocar lisis celular.

2.- Desproteínizar empleando una mezcla de isotiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo, de manera que se provoque la precipitación de las proteínas y puedan separarse mediante centrifugación. Se forman dos fases en las cuales, en la fase acuosa que queda en la parte superior, se encuentran los ácidos nucleicos, mientras que en la interfase y en la fase orgánica que queda en el inferior, queda la proteína desnaturalizada. La fase orgánica se desecha y la acuosa se transfiere a tubos nuevos para realizar la separación de los ácidos nucleicos.

3.- La mezcla de ácidos nucleicos se separa mediante precipitaciones del RNA con isopropanol a bajas temperaturas (-20°C). Al centrifugar, se forma una pastilla que después de secada se resuspende en una solución amortiguadora de Tris 10mM/ EDTA 1mM/SDS 0.1% (TES) y posteriormente se agrega el equivalente a un décimo del volumen de muestra, de acetato de sodio 3M y etanol a -20°C. Al centrifugar esta mezcla, se observa una pastilla blanca en el fondo que después de secada se resuspende en agua, acetato de sodio 3M y etanol a -20°C.

4.- Por último, centrifugamos una vez más y la pastilla que se forma, se seca y se resuspende en 22µl de agua.

5.- La concentración de RNA se obtiene midiendo densidad óptica a 260 y 280 nm de 2µl del RNA aislado en 500µl de agua. Una solución de RNA cuya densidad óptica a 260 nm es igual a 1, contiene aproximadamente 40µg de RNA por mililitro.

### 3.16.2 Tejidos

Se pesa el vaso de precipitados que se va a emplear para colocar el órgano deseado, con PBS. Se extrae el órgano y se corta en pedazos pequeños. Se centrifuga y se coloca la pastilla obtenida en morteros previamente enfriados con hielo seco. Se agrega nitrógeno líquido y se pulveriza el tejido hasta tener un polvo fino; este polvo fino se transfiere a un tubo nuevo que contiene RNAzol-B. El procedimiento continúa igual que para la extracción de

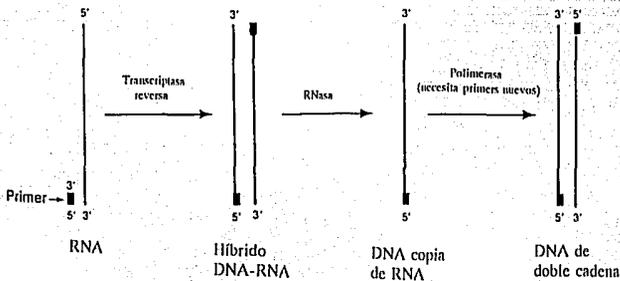
RNA de cultivos celulares (Figura 14).



**Figura 14.** RNA aislado de diferentes células y tejidos. Carril 1 y 2. HepG2; Carril 3 y 4. Hígado; Carril 5 y 6. Corazón; Carril 7 y 8. Pulmón; Carril 9 y 10. Intestino; Carril 11 y 12. Ovario. El gel muestra los RNAs correspondientes al RNA ribosomal 28S, 18S, y 5.8S.

### 3.17 RT-PCR

Fundamento: El material del que se parte para PCR, es DNA de doble cadena, el cual puede ser DNA genómico o cDNA. Si se parte de cDNA es necesario sintetizarlo a partir de RNA y oligonucleótidos con secuencias al azar, o bien con oligo dT si se parte de RNA mensajero. La enzima que lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria al RNA es la transcriptasa reversa, la cual provoca la extensión de los oligonucleótidos y produce la cadena complementaria, creando un híbrido RNA-cDNA (Figura 15).



**Figura 15.** Síntesis de cDNA a partir de RNA empleando la transcriptasa reversa.

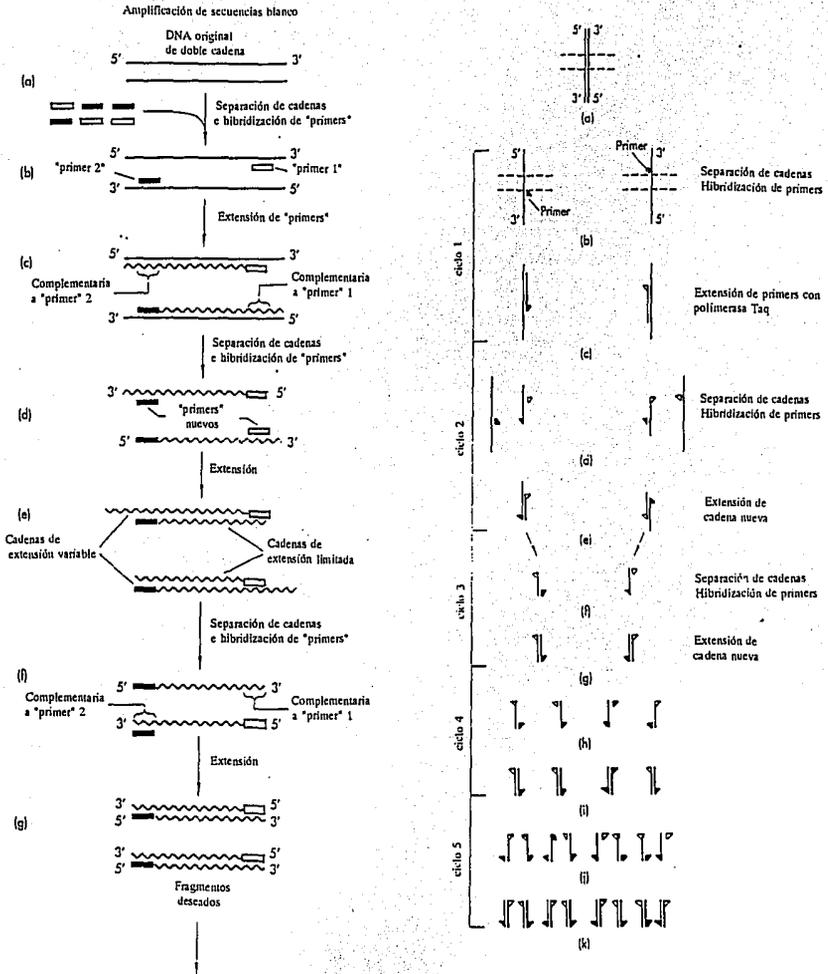
Para sintetizar el cDNA de doble cadena, se desnaturaliza la cadena híbrida anterior y se sintetiza la cadena complementaria con ayuda de la DNA polimerasa I.

Una vez que se tiene DNA de doble cadena, las cadenas se separan mediante calentamiento y posteriormente se enfrían rápidamente para favorecer la hibridización de los oligonucleótidos sintetizados que sirven como "primers", a sus sitios correspondientes en cada cadena. La Taq polimerasa sintetiza las cadenas complementarias correspondientes de longitudes variables. La reacción se calienta nuevamente con el objeto de separar las cadenas recientemente creadas y se favorece la unión de los primers a cada una de las cadenas que se tienen en la reacción: uno en cada una de las cadenas de la molécula de DNA original y 2 en las cadenas nuevas. La polimerasa Taq sintetiza nuevamente cadenas complementarias, pero esta vez la extensión de estas cadenas está limitada exactamente a la secuencia blanco; las cadenas nuevas contienen únicamente la secuencia limitada por los primers.

El proceso se repite y los primers se hibridizan a las nuevas cadenas (y a las anteriores). La polimerasa Taq sintetiza cadenas complementarias, produciendo dos fragmentos de molécula de DNA de doble cadena que son idénticos a la secuencia blanco. Este proceso se repite (Figura 16). Todos los componentes necesarios para llevar a cabo estas reacciones: templado de DNA, nucleótidos para la síntesis de secuencias complementarias, oligonucleótidos que sirven como "primers" específicos y la Taq polimerasa, están presentes en una misma mezcla de reacción. La transición entre desnaturalización del templado de doble cadena, la hibridización del primer al templado de DNA, y la síntesis de una nueva cadena complementaria, se lleva a cabo por cambios controlados en la temperatura de la reacción.

En general, la técnica de RT-PCR incluye los siguientes pasos principales<sup>(71,72)</sup>:

1. Desnaturalizar RNA y renaturalizar en presencia de "random primers" u oligo dT.
2. Agregar mezcla para cDNA (Mg<sup>++</sup>, nucleótidos, amortiguador, transcriptasa reversa, inhibidor de RNasa). La transcriptasa reversa trabaja a 42°C, y a 99°C se elimina la enzima residual.
3. Durante la reacción de la polimerasa, la temperatura de 95°C es para desnaturalizar el DNA; a 72°C se lleva a cabo la extensión (reacción con la Polimerasa Taq) y a 37-65°C se realiza la hibridización o apareamiento



**Figura 16.**

Reacción de la polimerasa en cadena (PCR). La reacción de la polimerasa en cadena lleva a la amplificación de secuencias blanco (izquierda); del lado derecho se muestra como el número de fragmentos se duplica en cada ciclo de reacción.

("annealing").

El RNA aislado de tejidos o de células se lleva a una concentración aproximada de 1µg.

Primero se desnaturaliza el RNA y se renaturaliza en presencia de los "random primers" siguiendo el siguiente esquema de temperaturas y tiempos:

65°C/10 min ---> Rampa 5 min---> 25°C/10 min

Se sintetiza el cDNA empleando hexámeros con secuencias de nucleótidos al azar, RNA, y la enzima transcriptasa reversa. Para sintetizar el cDNA, se sigue la siguiente combinación de tiempos y temperaturas:

42°C/45 min

99°C/5 min

5°C/5 min

Una vez que se sintetizó el híbrido RNA-cDNA, se realiza la amplificación empleando los oligonucleótidos sintetizados a partir de la secuencia de CETP y la enzima DNA polimerasa, que sintetiza la cadena complementaria a la cadena de cDNA. Para amplificar la secuencia deseada, se sigue el siguiente esquema:

95°C/10 min

95°C/1 min

42°C/1 min

Rampa 2 min/30°C      3 ciclos

72°C/3 min

95°C/1 min

55°C/1.5 min      35 ciclos

72°C/3 min

72°C/10 min

4°C/HOLD

### 3.18 Geles de agarosa

#### 3.18.1 DNA

El DNA obtenido por PCR, se somete a electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE (Tris/acetato/EDTA). Las condiciones de corrida son de 75 V de voltaje a temperatura ambiente, durante un tiempo aproximado de dos horas o una hora y media.

Al concluir la corrida, los geles se tiñen con bromuro de etidio y se observan con luz ultravioleta.

#### 3.18.2 RNA

El RNA aislado de células o tejidos, se somete a electroforesis en geles de agarosa al 1% con formaldehído en MOPS. Las condiciones de corrida son de 100 V de voltaje a temperatura ambiente, durante un tiempo aproximado de 4 horas.

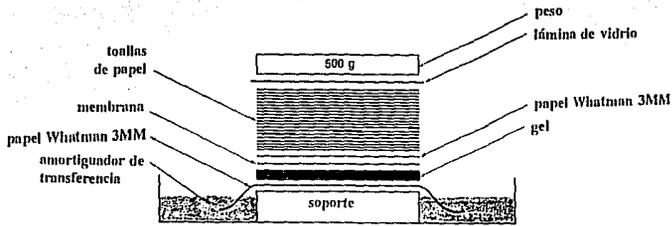
Al concluir la corrida se observa el gel con luz ultravioleta.

### 3.19 Southern blot

Las secuencias de DNA obtenidas por PCR se someten a electroforesis en geles de agarosa y el DNA es transferido a un soporte sólido (generalmente membranas de nylon o filtros de nitocelulosa), en la posición que se encontraba en el gel<sup>(73)</sup>.

El DNA en el gel es expuesto a bases fuertes (NaOH 5N, NaCl 5M) para llevar a cabo la depuración durante 30 minutos; posteriormente se neutraliza empleando Tris 2M, NaCl 5M durante 30 minutos y por último se enjuaga con agua destilada durante 5 minutos.

La transferencia del DNA a la membrana se realiza por capilaridad, en donde los fragmentos de DNA del gel se eluyen por el flujo del amortiguador de transferencia (SSC 10X (cloruro de sodio/citrato de sodio)), y se depositan en la superficie de la membrana (Figura 17).



**Figura 17.** Transferencia por capilaridad de DNA de geles de agarosa

La velocidad de transferencia del DNA depende del tamaño del fragmento y de su concentración en el gel.

El DNA unido a la membrana se une covalentemente a ésta por exposición a luz U.V. de onda corta, para ser hibridado con una sonda radioactiva específica de DNA. Posteriormente se realiza una autorradiografía para localizar la posición de las bandas de DNA complementarias a la sonda.

Como sonda se seleccionó un oligonucleótido con secuencia interna a los fragmentos amplificados por PCR. El marcaje de estos oligonucleótidos se realiza siguiendo el protocolo que se muestra a continuación:

H <sub>2</sub> O	6µl
DNA oligo	1µl (50 a 100 ng)
10X buffer cinasa	1µl
ATP <sup>32</sup> P (gamma) 1000µC-mmol	1.5µl
T4 polinucleótido cinasa	0.5µl

Esta mezcla se incuba durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se inactiva a la cinasa incubando por 15 minutos a 65°C.

**MEZCLA DE PREHIBRIDACION**

stock SSC 20X	3ml
Denharts (stock 50X)	200µl
SDS 10%	500µl
DNA de salmón (stock 10 mg/ml)	40µl
Pirofosfato de sodio 10%	50µl
H <sub>2</sub> O	6.21ml

La prehibridación se lleva a cabo a 37°C durante 4 horas o más.

**MEZCLA HIBRIDACION**

stock SSC 20X	3ml
Denharts (stock 50X)	200µl
tRNA de levadura (10 mg/ml)	20µl
Pirofosfato de sodio 10%	50µl
H <sub>2</sub> O	6.73ml

Se añade la sonda previamente filtrada a través de un filtro de 0.22µm conectado a una jeringa de 1 ml en aproximadamente 500µl de solución de hibridación.

La hibridación se lleva a cabo a 37°C durante 8 horas - toda la noche.

Por último, la membrana se lava en SSC 6X a 42-50°C dependiendo de la astringencia deseada.

## 4. RESULTADOS

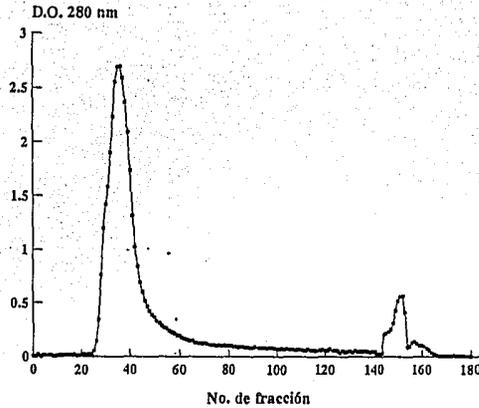
### 4.1 Purificación de CETP

Con el objeto de obtener una preparación enriquecida de CETP, las proteínas contenidas en la fracción de plasma libre de lipoproteínas ( $d > 1.21$  g/ml) fueron sometidas a cromatografía en columna empleando resinas de fenil-sefarosa y de concanavalina A-sefarosa ya que CETP es una glicoproteína altamente hidrofóbica. De esta manera, se pudo obtener una preparación lo suficientemente enriquecida para los ensayos de transferencia que realizamos. Como primer paso de purificación se empleó una columna hidrofóbica que se eluyó con amortiguadores de diferente fuerza iónica: al eluir con NaCl 4M/Tris 10mM/EDTA 2 mM, pH=7.4 se retuvieron en la resina proteínas hidrofóbicas y se eluyeron primero proteínas no afines a la resina (carril B, Figura 20). Al bajar la fuerza iónica cambiando la concentración del cloruro de sodio a 150mM/Tris 10mM/EDTA 2mM, pH=7.4, se eluyeron proteínas poco afines a la resina (carril C, Figura 20). Por último, al disminuir por completo la fuerza iónica eluyendo con agua destilada, se eluyeron las proteínas muy hidrofóbicas (entre ellas CETP) que se encontraban unidas fuertemente a la resina (carril D, Figura 20).

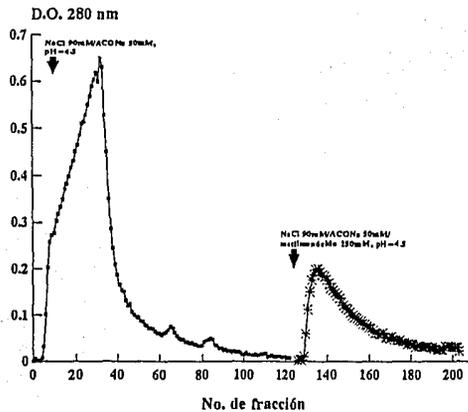
Al eluir con agua destilada, se observó el patrón de elución mostrado en la **Figura 18**. Las fracciones de la 26 a la 45 contienen a un grupo de proteínas entre las que se encuentra CETP (carril D, Figura 20). Por otro lado, las fracciones 145-160 contienen una mezcla de proteínas, entre las que también se encuentra CETP (carril E, Figura 20).

Las fracciones 26-45 colectadas de la columna anterior, se sometieron a una columna de concanavalina A-sefarosa. Esta se eluyó con acetato de sodio 50mM/NaCl 90 mM, pH=4.5 para coleccionar un grupo de proteínas (principalmente albúmina) las cuales quedaron comprendidas entre las fracciones 4 a la 40 (carril F, Figura 20). La elución de esta columna continuó con el mismo amortiguador adicionando  $\alpha$ -metil-D-manósido 150mM provocando que las glicoproteínas muy afines a la resina se desprendieran y eluyeran de la columna para quedar comprendidas entre las fracciones 125-150. El patrón de elución de esta columna, se muestra en la **Figura 19**. Estas últimas fracciones, contienen en su mayor parte a una proteína de 74 kDa que corresponde a CETP y otra de aproximadamente 55 kDa (carril G, Figura 20), la cual corresponde a la misma proteína no glicosilada.

La fracción de CETP que se obtiene de la columna de concanavalina A-sefarosa al eluir con  $\alpha$ -metil-D-manósido,



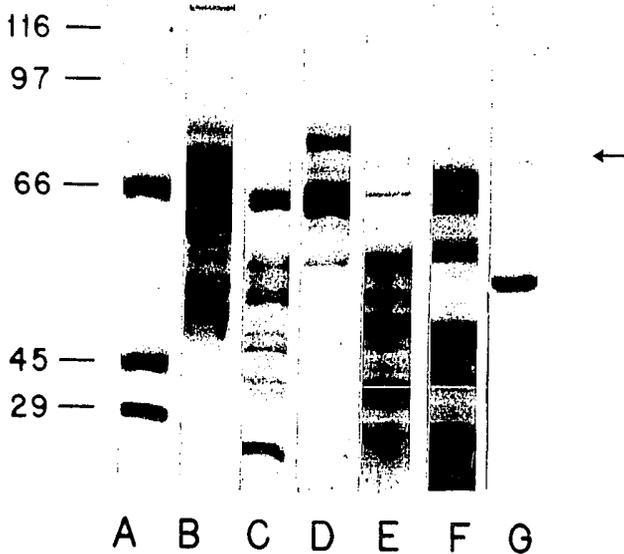
**Figura 18.** Cromatografía en fenil-sefaraosa. Se aplicaron 120 ml de muestra  $d > 1.21$ /ml. Después de eluir con amortiguadores de diferente fuerza iónica, se eluyó con agua destilada. Se colectaron 180 fracciones de 3 ml y se juntaron las fracciones de interés (26-45 y 145-160).



**Figura 19.** Cromatografía en ConA-sefaraosa. Se aplicaron 30 ml que contenían las fracciones de interés obtenidas de fenil-sefaraosa. Después de eluir las proteínas no afines a la resina con NaCl 50mM/Acetato de sodio 90mM, pH=4.5, las fracciones de interés de eluyeron con el mismo amortiguador mas 150mM de  $\alpha$ -metil-D-manósido.

se empleó en todos los ensayos de transferencia.

En un principio, la purificación de CETP se realizó empleando una columna de CM-celulosa entre las dos columnas anteriores, pero en vista de que la fracción final que se obtenía al emplear sólo dos columnas estaba lo suficientemente enriquecida para los ensayos que realizamos, únicamente empleamos las dos columnas antes citadas: fenil-sefarosa y concanavalina A-sefarosa.



**Figura 20.** Gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones obtenidas de fenil-sefarosa: a) marcadores de peso molecular, b) NaCl 4M/Tris-Hcl 10mM/EDTA 2mM, pH 7.4, c) NaCl 150mM/Tris-Hcl 10mM/EDTA 2mM, pH 7.4, d) agua destilada, e) agua destilada (segundo pico), f) NaCl 50mM/Acetato de sodio 90mM, pH 4.5, g) NaCl 50mM/Acetato de sodio 90mM/ $\alpha$ -metil-D-manósido 150mM, pH 4.5.

## 4.2 Medición de la actividad de CETP

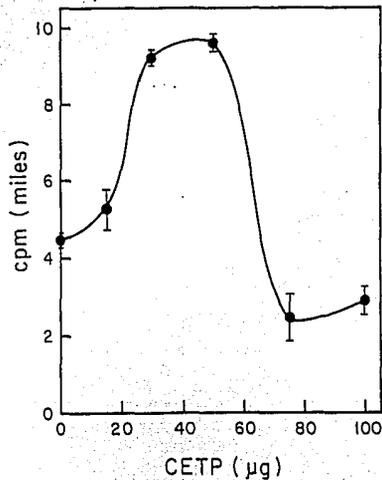
Ya que CETP en condiciones fisiológicas, es capaz de transferir ésteres de colesterol entre lipoproteínas, para medir su actividad se realizaron ensayos en los que se emplearon como partículas donadoras de ésteres de colesterol a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y como partículasceptoras a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La decisión de emplear a LDL como partícula donadora y a HDL como aceptora en el ensayo, no fue basándonos en alguna razón de tipo fisiológica de transferencia de ésteres de colesterol en esa dirección, sino más bien que LDL y HDL pueden separarse fácilmente mediante precipitación empleando un polianión y un catión divalente, explicada con mayor detalle en el capítulo dedicado a las técnicas.

Después de incubar durante 3 horas a 37°C diferentes concentraciones de CETP (de 0-100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de HDL, 50 $\mu\text{l}$  de LDL y amortiguador NaCl 150mM/Tris 10mM, pH=7.4, la reacción se detuvo con heparina/Mn<sup>++</sup> precipitando a las partículas donadoras, y midiendo la transferencia de marca radiactiva a las partículasceptoras (HDL) que permanecen en el sobrenadante. Para cada punto se realizó un blanco que contenía únicamente amortiguador, LDL y HDL, los cuales se sometieron al mismo tratamiento que los tubos problema.

La **Figura 21** muestra la cantidad de marca transferida a las partículasceptoras donde se observa que a medida que la concentración de CETP aumenta, la transferencia también aumenta hasta alcanzar una concentración óptima de proteína entre 35-60  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , después de la cual disminuye. Cada punto corresponde al promedio de dos experimentos  $\pm$  ESM (error estándar medio).

Como la preparación que se obtiene de CETP no está totalmente pura, es muy probable que la tendencia que se observa cuando la concentración de proteína es  $> 60\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se deba a un efecto de interferencia dado por pequeñas cantidades de albúmina u otras proteínas plasmáticas contenidas en la fracción de CETP, que tienen la capacidad de unir colesterol así como la de competir por el sitio de unión de CETP a las lipoproteínas.

Al observar la figura 21, es posible percatarse de la existencia de transferencia cuando la concentración de proteína es nula; adjudicamos ésto al hecho de que incluidos en la fracción de LDL probablemente se encuentran liposomas empleados inicialmente para marcar estas partículas. La difusión de ésteres de colesterol de estos liposomas a las lipoproteínas podría explicar el efecto que se observa con la basal en la figura 21.



**Figura 21.** Medición de actividad de CETP. Diferentes concentraciones de proteína se incubaron durante 3 horas a 37°C con concentraciones constantes de lipoproteínas. Como partícula donadora se empleó [<sup>14</sup>C]-LDL y como aceptora HDL.

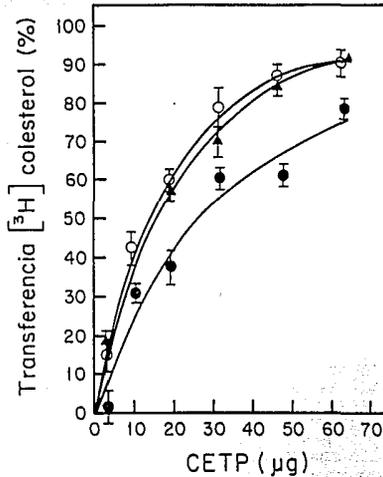
Independientemente de este efecto, al adicionar al menos 15 µg de proteína, ya se observa transferencia significativa, la que aumenta considerablemente cuando se utilizan 35 µg.

### 4.3 Ensayos de transferencia

Como punto de partida para comprobar si CETP incorporada en membranas artificiales es capaz de facilitar la transferencia de colesterol libre entre HDL y membranas artificiales, fue necesario establecer ciertas condiciones de transferencia específica que permitieran observar este proceso.

Se ensayaron diferentes cantidades de proteína con una cantidad constante de partículas donadoras, [<sup>3</sup>H]colesterol-HDL, y se midió la transferencia en un lapso de 3 horas de incubación a 37°C (Figura 22a). Se emplearon liposomas de fosfatidilcolina/colesterol como control y liposomas con CETP incorporada para observar si existe transferencia facilitada en presencia de esta proteína.

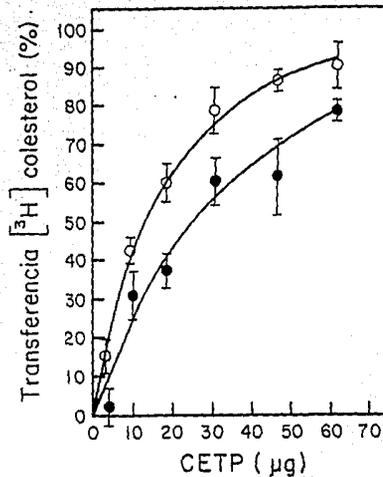
Como se observa en la Figura 22a, los liposomas control *per se* incorporan en sus membranas moléculas de colesterol, ya que existe difusión de colesterol por la diferencia de concentración que existe entre los liposomas



**Figura 22a.** Ensayos de transferencia de colesterol. Diferentes cantidades de proteína se incubaron durante 3 horas a 37°C con una cantidad constante de partículas donadoras [<sup>3</sup>H]-colesterol HDL. (●) liposomas control; (▲) liposomas CETP en el medio de reacción; (○) liposomas CETP incorporada mediante sonicación.

y la partícula donadora; cuando se forma un gradiente de concentración, las moléculas de colesterol que se encuentran en la región de alta concentración tienden a moverse o difundir, hacia la región de menor concentración hasta alcanzar un equilibrio en el cual la concentración en ambas regiones es la misma, obedeciendo la ley de Fick: la cantidad de partículas que difunden a través de un área determinada en un periodo de tiempo dado, es proporcional al gradiente de concentración que se forma en ese punto; sin embargo, en el sistema de liposomas/CETP se observa una transferencia mayor que aumenta al incrementar la concentración de proteína. Se realizaron dos tipos de ensayos empleando CETP; en uno de ellos, CETP se incorporó a liposomas de fosfatidilcolina/colesterol, mediante sonicación en un baño de agua; en el otro, se emplearon liposomas con CETP añadida exclusivamente al medio de reacción. Si observamos la Figura 22a, nos percatamos de que no existe diferencia significativa entre ambos ensayos, ya que CETP forma complejos estables con los fosfolípidos de los liposomas aún sin sonicación<sup>(16)</sup>. Por lo anterior, los ensayos posteriores se realizaron únicamente añadiendo la proteína al medio de reacción, sin llevar a cabo el proceso de sonicación.

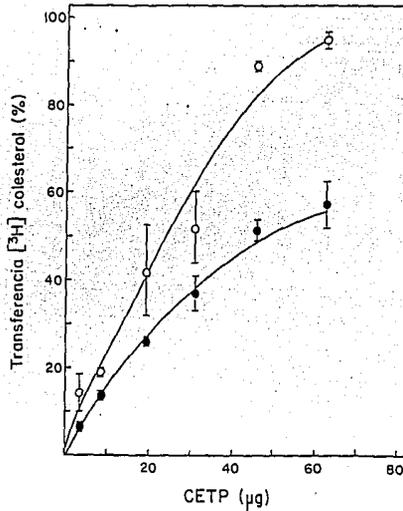
Si se toma como valor basal la cantidad de colesterol incorporado por los liposomas control, observamos que existe una transferencia significativa en el orden de 10% mayor cuando CETP está presente. Por lo tanto CETP reconstituida es capaz de transferir colesterol libre en un sistema de liposomas/lipoproteínas. Sin embargo, al emplear liposomas preparados 12 horas antes a la realización del ensayo y no minutos antes al mismo como en



**Figura 22b.** Ensayos de transferencia de colesterol empleando liposomas preparados 30 minutos antes de realizar los ensayos. Diferentes cantidades de proteína se incubaron durante 3 horas a 37°C con una cantidad constante de partículas donadoras  $[^3\text{H}]$ -colesterol HDL. (●)liposomas control; (○)liposomas CETP.

los ensayos anteriores (Figura 22b), se observa una transferencia aún mayor, en el orden de 30% (Figura 23). Esta diferencia puede deberse fundamentalmente a la estabilidad que puede adquirir CETP en la membrana si permitimos que esté en contacto con ella por un tiempo relativamente largo. Cada punto representado en las figuras 22a y 22b, y 23, corresponde al promedio de tres experimentos  $\pm$  ESM.

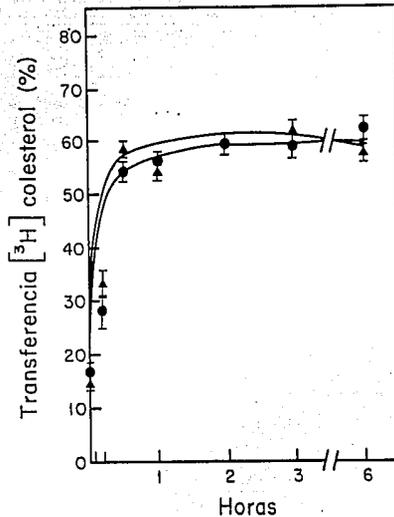
Para marcar las lipoproteínas, es necesario incubárlas con liposomas que contengan la marca radiactiva, y ya que no puede llevarse a cabo su absoluta separación por medio de centrifugación, suponemos que en la fracción de



**Figura 23.** Ensayos de transferencia de colesterol empleando liposomas preparados 12 horas antes de realizar los ensayos. Diferentes cantidades de proteína se incubaron durante 3 horas a 37°C con una cantidad constante de partículas donadoras [<sup>3</sup>H]-colesterol HDL. (●)liposomas control; (○)liposomas CETP.

HDL se encuentran presentes aún liposomas que contienen [<sup>3</sup>H]-colesterol. Por lo tanto, no descartamos la posibilidad de que exista transferencia entre este tipo de liposomas y los liposomas empleados en el ensayo. Esto nos sugiere que CETP no es capaz únicamente de realizar transferencia de lípidos en un sistema que involucre lipoproteínas, sino que puede realizar su función entre diferentes sistemas membranales: entre lipoproteínas, entre membranas artificiales y entre lipoproteínas y membranas artificiales.

Por otro lado, se realizaron ensayos de transferencia en los que se mantuvo constante la cantidad de proteína, variando el tiempo de incubación a 37°C, desde un minuto hasta seis horas. Se realizaron dos controles, uno empleando liposomas de fosfatidilcolina/colesterol únicamente, y otro empleando los mismos liposomas con citocromo oxidasa reconstituida como una proteína control intrínseca de membrana. Estos controles no parecen favorecer la transferencia de colesterol de HDL a liposomas. En un principio se utilizaron liposomas preparados minutos antes de realizar el ensayo, y la diferencia en la transferencia que existe entre los liposomas control y los liposomas/CETP, es prácticamente nula (Figura 24). Sin embargo, en los siguientes ensayos se emplearon



**Figura 24.** Ensayos de transferencia de colesterol empleando liposomas preparados minutos antes de realizar los ensayos. Cantidades constantes de partículas receptoras y donadoras se incubaron durante 3 horas a 37°C durante diferentes tiempos. (●)liposomas control; (▲)liposomas CETP.

liposomas preparados la noche anterior a la realización del ensayo ya que en ensayos previos habíamos observado diferencias significativas entre los ensayos realizados con liposomas preparados minutos antes de realizar el ensayo, y los preparados la noche anterior a la realización del mismo (Figura 25).

Los puntos de la figura 24 representan el promedio de dos experimentos  $\pm$  ESM, mientras que los de la figura 25 representan el promedio de tres experimentos  $\pm$  ESM.

En estos ensayos se observa nuevamente que los liposomas control *per se* incorporan en sus membranas moléculas de colesterol por el fenómeno de difusión antes descrito, el cual se presenta al existir diferencia de concentración de colesterol entre las partículas involucradas (liposomas y partícula donadora); sin embargo, al encontrarse CETP en el medio, la transferencia aumenta considerablemente conforme aumenta el tiempo de incubación. Se observa que dentro de los diez primeros minutos de incubación, se lleva a cabo prácticamente el 50% de transferencia y que después de 30 minutos o 1 hora de incubación, la transferencia no se modifica sustancialmente.

La diferencia entre los liposomas control, en los que se lleva a cabo transferencia de colesterol por difusión simple

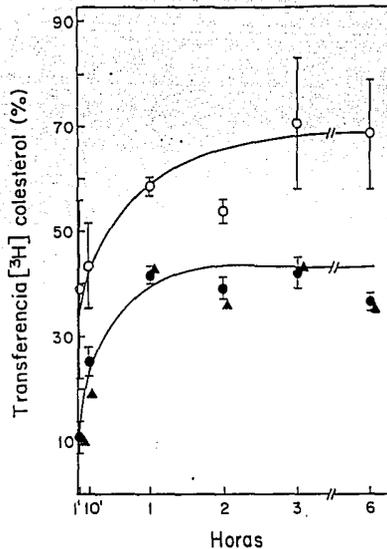


Figura 25. Ensayos de transferencia de colesterol empleando liposomas preparados 12 horas antes de realizar los ensayos. Cantidades constantes de partículas donadoras y receptoras se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos. (●) liposomas control; (○) liposomas CETP; (▲) liposomas citocromo oxidasa.

del lípido, y los liposomas que contienen CETP, puede explicarse suponiendo que CETP es capaz de facilitar no sólo la incorporación del colesterol en la monocapa externa de los liposomas, como sucedería en los liposomas control, sino también en la monocapa interna, logrando una mejor distribución del lípido, ya que la cantidad de colesterol transferido es prácticamente del doble cuando la transferencia es mediada por CETP.

Cabe señalar, que las muestras control que contienen únicamente amortiguador y partículas HDL, cuando se incuban por tiempos largos (entre 2 y 6 horas), presentan aún transferencia de marca de los liposomas a las lipoproteínas, ya que conforme aumenta el tiempo, la marca contenida en el sobrenadante de los tubos control también se incrementa. Una vez más, pensamos que la diferencia que se observa entre los ensayos realizados con liposomas preparados 30 minutos antes de realizar el ensayo, y liposomas preparados con 12 horas de anticipación, puede deberse fundamentalmente a la estabilidad que adquiere CETP en la membrana.

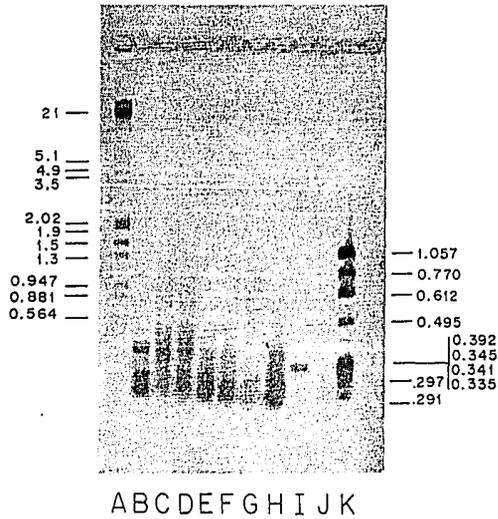
#### 4.4 RT-PCR

En vista de las similitudes estructurales y cinéticas que encontramos entre CETP y CHTP en el estudio que realizamos, decidimos continuar con la comparación entre ambas proteínas e iniciar la clonación de CHTP, utilizando una estrategia basada en el conocimiento molecular de CETP ya que para el aislamiento de CHTP se necesitan cantidades importantes de tejido y mucho tiempo, para obtener cantidades muy pequeñas de proteína. Al conocer la secuencia de cDNA completa que codifica para CETP logramos sintetizar seis pares de oligonucleótidos específicos para CETP con sitios de restricción en cada extremo (Figura 12), con el objeto de amplificarlos por medio de PCR. Únicamente la secuencia de CETP o secuencias similares logran amplificarse empleando estos oligos. Se aisló RNA total de hepatoma humano (línea celular HepG2) (Figura 14), del cual se sintetizó el cDNA correspondiente; utilizando diferentes combinaciones de los oligonucleótidos sintetizados, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR y los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa.

Dos de los seis pares probados generaron un producto de amplificación del tamaño esperado, sugiriendo que se amplificaron fragmentos del cDNA de estas células homólogos a la secuencia de CETP. El par 106-204 permitió la amplificación de un fragmento de aproximadamente 564 pb. Sin embargo, el par 104-202 permitió la amplificación de un fragmento del tamaño esperado (385 pb), mucho más evidente que el obtenido por el par 106-204 (Figura 26, carril B: \*).

De igual manera, en tejidos que no contribuyen de manera significativa a la secreción de CETP al plasma, como pulmón, corazón, intestino y ovario, al probarse con el par 104-202 se amplificaron señales evidentes, de la longitud esperada (Figura 26, carriles C, D, E y F).

La hibridación de un oligonucleótido interno al par 104-202 dio una señal positiva en un análisis de "Southern", demostrando la presencia de secuencias similares a CETP en fragmentos de PCR derivados de cDNA de hepatoma humano (HepG2), validando nuestro método de aislamiento y caracterización.



**Figura 26.**

Productos de amplificación de PCR con oligonucleótidos de CETP resueltos en gel de agarosa. El cDNA fue preparado por transcripción reversa de RNA total de: HepG2 (B), ovario (C), pulmón (D), intestino (E), corazón (F), AS-30D (G), e hígado (H). Este cDNA sirvió como templado de amplificación usando oligos específicos para CETP que generan un producto esperado de 385 bases (★). Control interno reacción de PCR IL-1 (interleucina-1) (I); reacción sin templado (J); marcadores de peso molecular (A) y (K).

## 5. DISCUSION

El importante fenómeno del intercambio de lípidos entre lipoproteínas y entre lipoproteínas y células de los tejidos se ha establecido sólidamente por investigaciones llevadas a cabo a lo largo de los años<sup>(74)</sup>. El descubrimiento de proteínas intercambiadoras de lípidos ha promovido en gran medida el estudio detallado de éstas en el fenómeno de intercambio lipídico. Mientras el intercambio de fosfolípidos, triacilgliceroles y ésteres de colesterol mediado por proteína ha sido descrito con claridad, un sistema de proteína que catalize la transferencia de moléculas de colesterol libre era desconocido y solamente hasta hace dos años en nuestro laboratorio uno de estos sistemas ha sido descrito<sup>(50)</sup>. En consecuencia, la transferencia de moléculas de colesterol ha sido estudiada por mecanismos no mediados por proteína, por lo que se ha pensado que muy probablemente este proceso juegue un papel importante en la transferencia de colesterol entre partículas lipoprotéicas, así como entre lipoproteínas y la membrana plasmática de las diferentes células. Se conoce que la dependencia del intercambio del proceso de transferencia está dada por las concentraciones de la partícula donadora así como de la partícula aceptora, que son críticas para que el intercambio lipídico ocurra. Una pregunta clave en la explicación del fenómeno de transferencia ha sido el determinar si se necesita contacto directo entre las partículas (modelo de formación de complejos de colisión) o bien, si las moléculas lipídicas pueden difundir a través de un espacio acuoso entre las partículas donadoras yceptoras. Los datos experimentales han sido frecuentemente interpretados en favor de uno u otro de estos modelos<sup>(12-17)</sup>, lo que ha provocado cierta confusión. (En el anexo I se da una descripción detallada de estos mecanismos).

En general el modelo de formación de complejos transitorios de colisión entre partículas se basa en la suposición de que las superficies celulares o las bicapas lipídicas, son capaces de unir muchas especies macromoleculares y de llevar a cabo el proceso de fusión. Sin embargo, si se lleva a cabo la fusión entre bicapas, todos los lípidos de éstas deberían ser transferidos a la bicapa aceptora, lo que no sucede.

El modelo de transferencia mediante la liberación del lípido a una fase acuosa está apoyado por numerosos hallazgos experimentales<sup>(12,13,15,17)</sup>, y se basa principalmente en que la aproximación de las bicapas lipídicas para que se lleve a cabo la transferencia de lípido, no es favorable energéticamente a distancias menores de 30 Å, dejando una capa acuosa entre ellas. En consecuencia, para que una molécula lipídica pueda ser transferida,

necesita desprenderse de la bicapa donadora, transferirse a través de este espacio acuoso, y alcanzar la bicapa aceptora.

Ya que la liberación del lípido de las partículas donadoras involucra la separación de éste de la interfase lípido-agua para pasar a la fase acuosa, la solubilidad de la molécula lipídica influye en la velocidad de liberación; esta separación del lípido de la partícula donadora hacia la fase acuosa, está asociada a una elevada energía de activación aún mayor a la asociada al proceso de transferencia del lípido.

Las interacciones del colesterol con las moléculas que se encuentran a su alrededor en la membrana determinan la velocidad a la cual se libera a la fase acuosa. La velocidad de intercambio o transferencia de colesterol es sensible a los siguientes parámetros<sup>(27)</sup>:

- 1) El grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos; el tiempo de vida media de intercambio de colesterol disminuye al aumentar las insaturaciones.
- 2) La relación esfingomielina/fosfatidilcolina (SM/PC); el tiempo de vida media aumenta al aumentar el contenido de SM.
- 3) La relación PC/colesterol; el tiempo de vida media disminuye relativamente cuando el colesterol se introduce a la bicapa lipídica.

En resumen, estas consideraciones teóricas de intercambio lipídico y de intercambio de colesterol en específico, implican que cuando las partículas tanto donadoras comoceptoras son estables y no existen proteínas intercambiadoras presentes, los datos de intercambio pueden ser explicados en términos de los mecanismos de difusión de las moléculas lipídicas a través de una fase acuosa. Es de esperar que la velocidad a que cualquier molécula lipídica incluyendo el colesterol, es transferida entre partículas donadoras yceptoras, sea dependiente de su estructura, así como de las estructuras y de la concentración de los dos tipos de partículas utilizadas.

Sin embargo, estos efectos mediados por lípidos no pueden ser los únicos que provoquen los cambios en los tiempos de vida media para la transferencia del colesterol, por lo que se deben estudiar otros aspectos de la estructura de la membrana, tales como proteínas con alta afinidad por colesterol o proteínas capaces de inducir interacciones entre los lípidos y el colesterol<sup>(75)</sup>.

Estudios realizados por Phillips y cols<sup>(27)</sup> empleando dos líneas celulares: Fu<sub>3</sub>AH y WIRL, confirman que el flujo de al menos 1/3 del colesterol en ambas líneas celulares sigue una cinética de primer orden con respecto a la concentración de colesterol libre en las células donadoras. Para Fu<sub>3</sub>AH, los tiempos de vida media de flujo de colesterol a 37°C, obtenidos para ensayos realizados tanto con células completas como las realizadas con vesículas membranales, es de  $3.2 \pm 0.6$  h y de  $3.9 \pm 0.5$  h respectivamente; los tiempos de vida media obtenidos con ensayos realizados con células WIRL son  $14.3 \pm 1.5$  h y  $11.2 \pm 0.7$  h. Como se observa, no existen diferencias significativas entre los ensayos realizados con células completas y vesículas membranales. Estos datos sugieren que la velocidad de liberación del colesterol de las células está regulado por la membrana plasmática, atribuyendo una importancia especial a la interacción del colesterol con proteínas membranales.

Tratando de intercalar nuestros hallazgos experimentales a estos mecanismos de transferencia bien establecidos, probablemente la presencia de proteínas facilitadoras o transferidoras de lípidos y en específico de colesterol entre lipoproteínas y membranas o entre membranas, permitiría que la alta energía de activación asociada al proceso de separación del lípido pudiera disminuir con la consiguiente disminución de la barrera energética involucrada en el proceso de transferencia. CHTP y CETP como se presenta en este trabajo, bien pudieran actuar siguiendo este mecanismo facilitador de la transferencia, donde la molécula de colesterol unida a la proteína no necesariamente debería disociarse totalmente de la partícula donadora y pasar a una fase acuosa antes de insertarse a la partícula aceptora, sino que estas proteínas, por su carácter hidrofóbico<sup>(5)</sup>, pudieran crear un ambiente energéticamente más favorable para la transferencia.

En general, se ha adjudicado a CETP un papel aterogénico, ya que esta proteína está involucrada en el transporte reverso del colesterol: el colesterol proveniente de tejidos extrahepáticos contenido en las HDL, regresa a ellos via LDL y VLDL por un mecanismo de transferencia mediado por CETP descrito con detalle en la introducción de este trabajo. La correlación positiva de CETP con la aterosclerosis parece deberse a la relación directa que existe entre esta proteína y la concentración de colesterol en las LDL<sup>(76)</sup>.

En muchas dislipidemias humanas asociadas con el desarrollo acelerado de aterosclerosis<sup>(77-79)</sup>, existe un incremento en la concentración plasmática de CETP y/o un aumento en la velocidad de transporte neto de ésteres

de colesterol desde HDL hacia lipoproteínas que contienen apoB (como LDL).

Recientemente se determinó que individuos homocigotos para la deficiencia de CETP provoca cambios en las lipoproteínas (aumento en HDL, disminución de ésteres de colesterol en VLDL, IDL y LDL), que están asociados con una resistencia a desarrollar enfermedades coronarias como la aterosclerosis. Esta deficiencia es común en Japón, y curiosamente estos individuos no presentan signos de acumulación de colesterol en sus tejidos o en sus lipoproteínas y parecen ser más longevos<sup>(60)</sup>.

Si CETP fuera capaz no sólo de llevar a cabo la transferencia de colesterol de HDL hacia las membranas artificiales con gran eficacia, como se muestra en este estudio (Figura 25), sino también fuera capaz de mediar la transferencia en sentido inverso (desde la membrana hacia HDL), se provocaría una mayor salida de este lípido de la membrana, y por consiguiente de la célula. Este fenómeno tendría importantes implicaciones fisiológicas. El papel de CETP en este proceso, se ve enfatizado por la amplia distribución de su mRNA en diferentes tejidos extrahepáticos<sup>(51,53)</sup>.

Si bien una gran variedad de tipos celulares tienen la capacidad de expresar CETP y de contener diferentes niveles del RNA mensajero que codifica para esta proteína<sup>(51,53)</sup>, el significado fisiológico de estas diferencias entre células que secretan esta proteína y células que sólo contienen el mensaje, aun se desconoce. En algunos casos, no existe relación entre los niveles de RNA mensajero y la secreción de esta proteína al plasma. Aunque líneas celulares como HepG2 y CaCo2 contienen RNA mensajero para CETP, la cantidad de proteína secretada es menor que la que secretan las células normales originales de donde se desarrollan estas líneas celulares tumorales<sup>(54,56,57)</sup>. Ya que sólo unos cuantos tejidos secretan esta forma de CETP al plasma, incluyendo tejido adiposo e hígado, muchos otros tejidos y tipos celulares que no lo hacen y que poseen RNA mensajero para CETP pudieran sintetizar otra forma de esta proteína localizada en la membrana que bien pudiera ser la proteína que nosotros bautizamos como CHTP.

Esta posible forma alterna de CETP podría jugar un papel importante en la dinámica del colesterol dentro de cada célula, facilitando la liberación del colesterol de la bicapa lipídica hacia las lipoproteínas.

Resulta interesante observar que la proteína CETP presente en el plasma sanguíneo diseñada para transferir ésteres de colesterol, pierda esta capacidad cuando se encuentra insertada o fuertemente asociada con una membrana para adquirir la capacidad de transferir colesterol libre. Una posible explicación a estos cambios pudiera ser que la presencia del ambiente hidrofóbico de la membrana, cambiara la estructura de CETP de tal manera que pudiera alterar su afinidad por los dos tipos de colesterol. Habría que determinar si estos cambios pudieran ser los que definirían la forma llamada CETP o CHTP.

En este sentido, continuaremos el estudio en paralelo entre CHTP y CETP desde el punto de vista cinético, estructural y de biología molecular con la finalidad de determinar si CETP y CHTP son la misma proteína que pudiera modularse dependiendo de su entorno, o si son dos formas de una misma familia de proteínas capaces de unir colesterol, fenómeno que pudiera estar relacionado a pequeños cambios estructurales.

## 6. CONCLUSIONES

- CETP se une rápidamente y con gran afinidad a liposomas formando un complejo capaz de transferir colesterol libre entre partículas, con gran eficacia.

- CETP, al ser reconstituida en membranas artificiales presenta la capacidad de transferir colesterol *no esterificado* entre partículas, siguiendo una cinética muy parecida a la que realiza CHTP.

- La señal positiva obtenida con un oligo específico para CETP en productos de PCR de HepG2, valida la metodología propuesta para deducir la secuencia de CHTP y secuencias de proteínas relacionadas.

- Creemos que estas dos proteínas, CHTP y CETP, las cuales comparten muchas características, pueden ser miembros de una misma familia de proteínas, importantes en la regulación de la homeostasis del colesterol en la membrana.

## 7. ANEXO I

A continuación dentro de esta sección se discutirán las condiciones teóricas de cada uno de los posibles mecanismos propuestos para el intercambio de lípidos.

En un sistema de partículas donadoras y aceptoras que llevan a cabo entre ellas colisiones sin que se lleve a cabo el fenómeno de fusión, la velocidad relativa de transferencia de lípidos deberá ser proporcional tanto al tipo de lípido como a la concentración de vesículas donadoras y de vesículas aceptoras, lo cual ha sido revisado por Lange<sup>(74)</sup>. Sin embargo, como se discutirá más adelante, de existir pasos intermediarios en el proceso de transferencia de lípidos, la cinética resultante mostrará una más compleja dependencia a la concentración tanto de vesículas donadoras como aceptoras. Está bien establecido por estudios realizados con modelos membranales, que la composición de la interfase lípido/agua de la partícula donadora, puede tener un efecto bastante significativo en la velocidad de transferencia del colesterol<sup>(81)</sup>. Se conoce que el colesterol no se asocia con todos los lípidos de la membrana con igual afinidad<sup>(82)</sup>. Se han desarrollado estudios que permiten conocer que en una mezcla de fosfolípidos como lo podrían ser fosfatidilcolina-esfingomiolina (PC-SM), fosfatidilcolina-fosfatidiletanolamina (PC-PE), esfingomiolina-fosfatidiletanolamina (SM-PE), fosfatidiletanolamina-fosfatidilglicina (PE-PG) y esfingomiolina-fosfatidilserina (SM-PS), el orden de preferencia de asociación sería  $SM > PS = PG > PC > PE$ <sup>(83,84)</sup>. De manera interesante, la preferencia observada del colesterol por SM sobre PC ha sido explicada con base en una mayor probabilidad en la formación de puentes de hidrógeno entre el colesterol y SM. Como ya hemos mencionado anteriormente, se han postulado dos posibles mecanismos que explican el fenómeno de transferencia de colesterol; éstos son la formación de complejos transitorios de colisión y el proceso de solubilidad de monómeros de lípido en agua. Las superficies celulares son capaces de unir muchas especies macromoleculares y de llevar a cabo el proceso de fusión con la membrana plasmática. Por lo tanto, se ha postulado que la formación de complejos transitorios de colisión pudieran mediar la transferencia de lípidos entre lipoproteínas y la membrana plasmática. Aplicando el principio cinético de acción de masas a este mecanismo de transferencia de lípidos de vesículas a células y siguiendo el análisis propuesto por Huestis y cols<sup>(85)</sup>, las velocidades iniciales de aparición del lípido nuevo en las células es la siguiente:

$$v_0 = \frac{dLc}{dt} = K_2 LcV$$

### Ecuación 1

donde  $Lc$  y  $Lcv$  y las diferentes constantes de velocidad ( $k$ ) son definidas como se muestra en la **Figura 27**. Aplicando el concepto de equilibrio rápido en el estado estacionario descrito a continuación, es posible derivar la siguiente expresión para  $v_0$ :

$$v_0 = \frac{k_1 K_2 L_{tot} C}{k_{-1} + K_2 + K_1 (\sigma L_{tot} + C)}$$

### Ecuación 2

donde  $L_{tot} = (L_v + L_{cv})$  es la concentración total de lípidos,  $C =$  al área de superficie de la célula (expresada en las unidades de concentración utilizadas para  $L_v$  y  $L_c$ ),  $\sigma$  es igual al radio del área celular al área de la vesícula en cada complejo de colisión transitoria ( $\theta = 0.25$  para una vesícula esférica ocupando un círculo del área membranal de la célula). Como se ha demostrado por Huestis y cols<sup>(63)</sup>, la ecuación 2 predice que  $v_0$  es proporcional a las concentraciones de las vesículas ( $L_{tot}$ ) y de las células ( $C$ ), cuando  $(k_{-1} + k_2) \gg k_1 (\sigma L_{tot} + C)$ ; esta condición puede ser esperada a concentraciones bajas de vesículas y células, donde la velocidad de transferencia del lípido es limitada por la velocidad de la formación de los complejos transitorios de colisión. Por otro lado, a una concentración de células dada,  $v_0$  es de primer orden con respecto a la concentración de las vesículas ( $L_{tot}$ ) a una concentración baja de  $L_{tot}$  y de orden cero para grandes concentraciones de  $L_{tot}$ . La dependencia de  $v_0$  en  $C$  a una concentración constante de vesículas es similar. Es de mencionarse que en principio, el modelo de colisión transitorio puede dar cinéticas de transferencia de lípidos similar al modelo de difusión en agua. Por lo tanto, el modelo de colisión de lípido predice que la transferencia de lípidos será de primer orden con respecto a la concentración de vesículas donadoras y de orden cero en la concentración de células receptoras cuando  $k_1 C \gg k_1 \sigma L_{tot} + k_{-1} + k_2$ . Es aparente que la deducción del mecanismo de transferencia de lípidos desde un punto de vista del comportamiento cinético, no es fácil de deducir a menos que todas las constantes de velocidad sean conocidas.

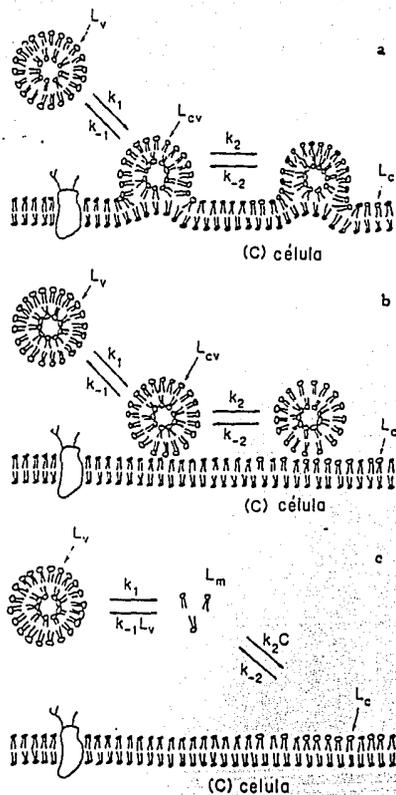


Figura 27.

Representación esquemática de los mecanismos de transferencia y recambio de lípidos. (a y b) transferencia y recambio de lípidos por complejos de colisión; (c) transferencia y recambio de lípidos por difusión del monómero a través de una fase acuosa. Abreviaciones:  $L_v$ , lípido contenido en la vesícula; C, células;  $L_{cv}$ , lípido contenido en los complejos de colisión célula-vesícula;  $L_c$ , lípido incorporado en las células;  $L_m$ , monómero lipídico <sup>(63)</sup>.

Por otro lado, se debe comentar que la formación de complejos de colisión transitorios son difíciles de explicar cinéticamente por la siguiente consideración: de existir estos complejos transitorios de colisión se promovería la formación de complejos de fusión, los cuales no pueden ser formados de una manera reversible; ésto significa que todos los lípidos de la vesícula en este proceso de fusión deberían ser transferidos a la célula aceptora, lo que no sucede. Además, ya que los coeficientes de difusión lateral de los diferentes lípidos, como lo podrían ser tanto fosfolípidos como el colesterol son similares, es difícil ver como estas moléculas pudieran transferirse a diferentes velocidades a pesar de poder pensar que estos complejos de colisión se pudieran formar en forma reversible. La formación de este tipo de complejos, muy probablemente, incluye una capa acuosa de por lo menos 30 Å de espesor entre las bicapas yuxtapuestas. La aproximación de bicapas a distancias menores que ésta, es energéticamente no favorable debido a las fuerzas repulsivas de hidratación de las cabezas de fosfolípidos de las bicapas. Consecuentemente, una molécula lipídica que es transferida a través de este espacio acuoso, muy probablemente tenga que separarse de la vesícula donadora para ser transferida a la bicapa aceptora; por lo tanto, este mecanismo puede considerarse muy parecido al mecanismo de difusión acuosa que a continuación se discutirá.

La transferencia de lípidos por medio de difusión de los monómeros en una fase acuosa ha sido discutida por varios investigadores<sup>(66)</sup>. Las diferentes constantes de velocidad y los factores involucrados en el proceso se esquematizan en la **Figura 28**; la velocidad a la que una molécula anfifílica se desprende de la superficie de la bicapa lipídica es proporcional a su concentración en esa superficie, y la velocidad de adsorción es proporcional al producto de la concentración del monómero libre y al área superficial de la membrana.

Las ecuaciones que describen la transferencia de una molécula anfifílica como el colesterol, entre dos tipos de vesículas compuestas por diferentes fosfolípidos A y B, son las siguientes:

$$\frac{d[C]_I}{dt} = k_{c,r} [C]_m (S_c [C]_I + S_A [A]_I) - k_{c,r} [C]_I$$

Ecuación 3

$$\frac{d[C]_{II}}{dt} = K_{c,rr} [C]_m (S_c [C]_{II} + S_B [B]_{II}) - k_{c,rr} [C]_{II}$$

Ecuación 4

$k_{c,r}^I$  y  $k_{c,r}^{II}$  son las constantes de velocidad de absorción de las moléculas de colesterol en las vesículas I y II respectivamente, mientras que  $k_c^I$  y  $k_c^{II}$  son las correspondientes velocidades de liberación de colesterol.  $[C]_m$  es la concentración del monómero de colesterol libre y  $[C]_I$ ,  $[C]_{II}$ ,  $[A]_I$  y  $[B]_{II}$  son las concentraciones del colesterol y de los fosfolípidos A y B en las vesículas I y II.  $S_A$ ,  $S_B$  y  $S_c$  son las áreas por mol de los fosfolípidos A y B y colesterol.

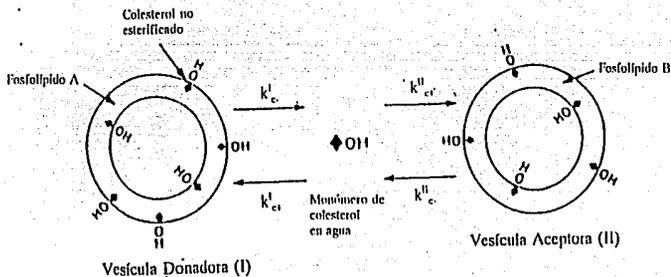


Figura 28.

Representación esquemática del intercambio o transferencia de colesterol libre a través de una fase acuosa, entre dos poblaciones de vesículas. Las constantes de velocidad  $k_c^I$  y  $k_c^{II}$  son las velocidades de liberación del colesterol, y  $k_{c,r}^I$  y  $k_{c,r}^{II}$  son las velocidades de adsorción del lípido.

En el estado estacionario,

$$\frac{d[C]_I}{dt} + \frac{d[C]_{II}}{dt} = 0$$

Ecuación 5

Sustituyendo las ecuaciones 3 y 4 en la 5 y resolviéndola para

$[C]_m$ ,

$$[C]_m = \frac{k_{c_1} k_{c_2} [C]_I + k_{c_2} [C]_{II}}{[k_{c_1} (S_c [C]_I + S_A [A]) + k_{c_2} (S_c [C]_{II} + S_B [B]_{II})]}$$

Ecuación 6

Al inicio, cuando todo el colesterol se encuentra en las vesículas I, produciendo que  $[C]_{II} = 0$ , la ecuación 4 se reduce a

$$\frac{d[C]_{II}}{dt} = k_{c_2} [C]_m S_B [B]_{II}$$

Ecuación 7

para la velocidad inicial de transferencia. Sustituyendo la ecuación 6 para  $[C]_m$  en la ecuación 7, obtenemos la velocidad inicial de transferencia de colesterol

$$v_o = \frac{d[C]_{II}}{dt} = \frac{k_{c_1} k_{c_2} [C]_I [B]_{II}}{k_{c_1} \left( \frac{S_c}{S_B} [C]_I + \frac{S_A}{S_B} [A] \right) + k_{c_2} [B]_{II}}$$

Ecuación 8

La ecuación 8 nos da la velocidad inicial de transferencia de colesterol cuando todo el colesterol se encuentra en la vesícula donadora y cuando tenemos las siguientes condiciones: (1) el colesterol se transfiere mucho más rápido que los fosfolípidos A y B, de manera que estos constituyentes permanecen constantes mientras se alcanza el equilibrio, y (2) cuando se cumple la condición del estado estacionario y esta condición se alcanza rápidamente en relación al proceso de transferencia.

También se observa de la ecuación 8 que  $v_o$  depende tanto de  $[A]_I$  como de  $[B]_{II}$ , de manera que  $v_o$  está en función de las concentraciones de las vesículas donadoras y receptoras.

Sin embargo, si la concentración de vesículas receptoras es mucho mayor que la de vesículas donadoras, donde  $(k_{et}^{II}[B]_{II} \gg k_{et}^I(S_D/S_B[C]_I + S_A/S_B[A]_I))$ , la ecuación 8 se reduce a

$$v_o = K_c^I [C]_I$$

#### Ecuación 9

Con concentraciones iguales de vesículas donadoras y receptoras, la ecuación 8 se simplifica también a la ecuación 9 si  $k_{et}^{II} \gg k_{et}^I$ ; esto indica que la estructura de las vesículas es importante ya que influyen en las velocidades de absorción del lípido. Es también aparente de la ecuación 9 que  $v_o$  es proporcional a la concentración de colesterol (cuando  $t = 0$  se asume que todo el colesterol se encuentra en las vesículas donadoras), e independiente de la concentración de las vesículas receptoras cuando éstas se encuentran en exceso o si  $k_{et}^{II} \gg k_{et}^I$ .

Ya que la liberación del colesterol de las partículas donadoras involucra la separación del lípido de la interfase lípido-agua a la fase acuosa, la solubilidad de la partícula anfifílica transferida influye en la velocidad de liberación. Esto se observa si consideramos las siguientes ecuaciones:

$$VM \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} V + M$$

#### Ecuación 10

En esta ecuación, VM es el lípido contenido en la vesícula donadora, V es la vesícula donadora después de que el lípido se ha desprendido, y M es el lípido en la fase acuosa. La velocidad de liberación del lípido está dada por la siguiente ecuación

$$\frac{dq}{dt} = k_1[VM] - k_2[V][M]$$

## Ecuación 11

donde  $k_1$  es una constante de velocidad de primer orden asociada con la liberación,  $[VM]$  es la concentración total del lípido que difunde en la población de vesículas donadoras, y  $k_2$  es una constante de velocidad de segundo orden asociada con la colisión de las moléculas del lípido de concentración  $[M]$  en la fase acuosa, con vesículas donadoras a una concentración  $[V]$ . Al equilibrio,  $dq/dt = 0$ , y la velocidad del paso de liberación del lípido es,

$$k_1 - k_2 \frac{[M][V]}{[VM]}$$

## Ecuación 12

Ya que  $[V]$  permanece constante normalmente,  $[M]/[VM]$ , el cual muestra la distribución del lípido que difunde entre la fase acuosa y la bicapa lipídica, es un parámetro importante cuando se determinan las velocidades de intercambio lipídico.

La significancia de la solubilidad en agua de moléculas anfífilas ha sido demostrada mediante la aplicación de las velocidades de reacción absolutas a la cinética de transferencia de moléculas con un balance variable de lipofobicidad/hidrofobicidad<sup>(67)</sup>. Existe una correlación entre la energía libre de transferencia de una molécula hidrofílica de un ambiente hidrofóbico a la fase acuosa ( $\Delta G_t$ ) y de la energía libre de activación ( $\Delta G_a$ ), donde  $\Delta G_a$  sea mayor que  $\Delta G_t$ . La velocidad de transferencia se incrementa cuando la longitud de las cadenas disminuye y cuando la polaridad de las cabezas de fosfolípidos aumenta manteniendo la longitud de la cadena constante. La barrera de la energía de activación está asociada con la separación de las moléculas lipídicas de la bicapa donadora hacia la fase acuosa. La altura de esta barrera de energía disminuye a medida que la polaridad o la solubilidad en agua de la molécula lipídica transferida aumenta. Por lo tanto, moléculas hidrofóbicas que tienen cierta solubilidad en agua en un rango micromolar pueden aparentemente, difundir libremente entre vesículas. Moléculas más hidrofóbicas como lo podrían ser fosfolípidos de cadena larga, así como la molécula colesterol, tienen una importante barrera de activación energética que se opone a su separación de la bicapa hacia

la capa acuosa. Ya que la energía de activación para la separación del colesterol o de fosfolípidos es elevada, la velocidad de intercambio de estas moléculas entre vesículas es fuertemente dependiente de temperatura. La velocidad de intercambio de lípidos entre vesículas unilamlares ha sido tratada en términos del modelo de la cinética de micelización desarrollada por Aniansson y cols.<sup>(68)</sup> Este modelo permite una predicción semicuantitativa de las velocidades relativas de transferencia de lípidos basadas en sus solubilidades en agua. Como anteriormente se menciona, la transferencia de moléculas lipídicas de una bicapa hacia la fase acuosa puede llevarse a cabo a través de complejos de transición, donde la molécula lipídica es unida a la partícula donadora por la punta de su cola hidrofóbica. La siguiente figura muestra un diagrama de energía libre de intercambio lipídico entre bicapas.

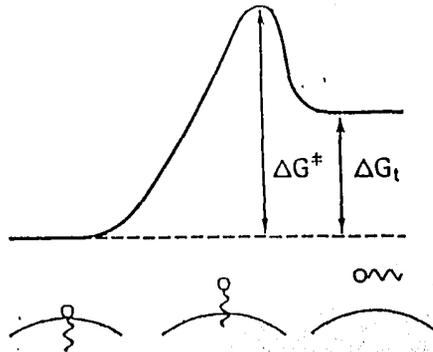
La formación de lo que se podría llamar como complejo de estado activado, está asociado con una alta energía de activación, la cual excede la energía libre de transferencia por una cantidad que está determinada, por lo menos en parte, por la unión de la molécula lipídica a la superficie de la bicapa de la vesícula. Las funciones termodinámicas asociadas con la formación de los complejos o estados de transición han sido calculados a partir de las constantes de velocidad experimentales utilizando la siguiente ecuación:

$$K \sim D_m \left( \frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \right)^2 \exp \frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}$$

ecuación 13

donde  $D_m$  es el coeficiente de difusión para la molécula lipídica que se disocia.  $D_m$  es similar al coeficiente de difusión libre y está calculado de la ecuación de Stokes-Einstein  $D = KT/(\zeta r)$  donde  $\eta$  es viscosidad y  $2r$  es la longitud de la especie que difunde. Como se observa en la figura 29 y se implica en la ecuación 13, el estado con mayor energía de activación a la largo de todo el proceso de transferencia, es cuando la molécula lipídica está casi completamente en la fase acuosa, pero permanece aún asociada a la superficie de la vesícula por la punta de su cola hidrofóbica. Tanto  $\Delta G_i$  como  $\Delta G_s$ , quedan determinadas por el efecto hidrofóbico de la molécula, de manera que ambas aumentan cuando la longitud de la cadena hidrofóbica aumenta.

En resumen, estas consideraciones teóricas de intercambio lipídico y de intercambio de colesterol en específico,



**Figura 29.** Diagrama de energía libre del intercambio de lípidos. La transferencia de las moléculas lipídicas desde una bicapa de lípidos hacia la fase acuosa, procede a través de la formación de un complejo en el estado de transición, donde la molécula permanece anclada a la vesícula por la punta de su cola hidrofóbica. La formación de este complejo está asociada con una muy alta energía de activación que excede a la energía libre de transferencia de la molécula.

implican que cuando las partículas tanto donadoras como receptoras son estables y no existen proteínas intercambiadoras presentes, los datos de intercambio pueden ser explicados en términos de los mecanismos de difusión de las moléculas lipídicas a través de una fase acuosa. Es de esperar que la velocidad a la que cualquier molécula lipídica incluyendo el colesterol, es transferida entre partículas donadoras y receptoras, sea dependiente de su estructura, así como de las estructuras y de la concentración de los dos tipos de partículas utilizadas.

Sin embargo, probablemente la presencia de proteínas facilitadoras o transferidoras de lípidos y en específico de colesterol entre lipoproteínas y membranas o entre membranas, permitiría que la alta energía de activación asociada al proceso de separación del lípido pudiera disminuir con la consiguiente disminución de la barrera energética involucrada en el proceso de transferencia. CHTP y CETP como se presenta en este trabajo, bien pudieran actuar siguiendo este mecanismo facilitador de transferencia, donde la molécula de colesterol unida a la proteína no necesariamente debería disociarse totalmente de la partícula donadora y pasar a una fase acuosa antes de insertarse a la partícula receptora, sino que estas proteínas, por su carácter hidrofóbico, pudieran crear un ambiente energéticamente más favorable para la transferencia.

8.  
BIBLIOGRAFIA

1. Innerarity, Thomas L. PLASMA LIPOPROTEINS. Encyclopedia of Human Biology. Volumen 6. (1991) Academic Press, Inc. pág: 23-35.
2. Brown, Michael S. y Joseph L. Goldstein. HIPERLIPROPOTEINEMIAS Y OTROS TRANSTORNOS DEL METABOLISMO. Principios de Medicina Interna. pág: 2017-2030.
3. Gotto, A. M. Jr. PLASMA LIPOPROTEINS. (1987) Elsevier Science Publisher B. V. Capítulo 9, pág: 277-297.
4. Brown, M. S. y J. L. Goldstein (1985) The LDL receptor and HMG-CoA reductase. Two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. *Curr. Top. Cell Regul.* **26:** 3-15.
5. Chajek, T. y C. J. Fielding (1978) Isolation and characterization of a human cholesterol ester transfer protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75:** 3445-3449.
6. Pattnaik, N. M., A. Montes, L. B. Hughes, y D. B. Zilversmith (1978) Cholesteryl ester exchange protein in human plasma. Isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* **530:** 428-438.
7. Ihm, I., J. L. Ellsworth, B. Chataing, y J. A. Harmony. (1982) Plasma protein-facilitated coupled exchange of PC & CE in the absence of cholesterol esterification. *J. Biol. Chem.* **257:** 4818-4827.
8. Morton, R. E. y D. B. Zilversmith (1982) Purification and characterization of lipid transfer protein(s) from human lipoprotein deficient plasma. *J. Lipid. Res.* **23:** 1058-1067.
9. Albers, J. J., J. H. Tollefson, C. Chen, y A. Stinmetz (1984) Isolation and characterization of human plasma lipid transfer proteins. *Atherosclerosis.* **4:** 49-58.
10. Tall, A. R., E. Abreu, y J. Shumar. (1983) Separation of a plasma phospholipid transfer protein from cholesterol ester/phospholipid exchange protein. *J. Biol. Chem.* **258:** 2174-2180.
11. Tall, A. R., L. R. Forester, y G. L. Bongiovanni. (1983) Facilitation of PC transfer into plasma HDL by an apolipoprotein in the density 1.20 - 1.26 g/ml fraction of plasma. *J. Lipid. Res.* **24:** 277-289.
12. Backer, J. M. y E. A. Dawidowicz. (1981) Mechanisms of cholesterol exchange between phospholipid vesicles. *Biochemistry.* **20:** 3805-3810.
13. McLean, L. R. y M. C. Phillips. (1981) Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or

- transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry*. **20**: 2893-2900.
14. Phillips, M. C., W. J. Johnson, y G.H. Rothblat. (1987) Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta*. **906**: 223-276.
  15. Lund-Katz, S., B. Hammerschlag, y M. C. Phillips. (1982) Kinetics and mechanism of free cholesterol exchange of cholesterol between membranes. *Biochemistry*. **21**: 2964-2969.
  16. Pattnaik, N. M. y D. B. Zilversmit. (1979) Interaction of cholesterol ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **254**: 2782-2786.
  17. Bruckdorfer, K. R., J. Crowe, y M. K. Sherry. (1984) Evidence for a water-soluble intermediate in exchange of cholesterol between membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **778**: 489-496.
  18. Bittman, R., S. Clejan, S. Lund-Katz, y M. C. Phillips. (1984) Influence of cholesterol on bilayers of ester-an-ether-linked phospholipids permeability and <sup>13</sup>C-Nuclear magnetic resonance measurements. *Biochim. Biophys. Acta*. **772**: 117-126.
  19. Lund-Katz, S. y M. C. Phillips. (1984) Packing of cholesterol molecules in human high-density lipoproteins. *Biochemistry*. **23**: 1130-1138.
  20. Lund-Katz, S. y M. C. Phillips. (1986) Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoproteins. *Biochemistry*. **25**: 1562-1568.
  21. Jackson, R. C., A. M. Gotto, O. Stein, y Y. Stein. (1975) A comparative study on the removal of cellular lipids from landschütz ascites cells by human plasma apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 7204-7209.
  22. Lange, Y. y B. V. Ramos. (1983) Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. *J. Biol. Chem.* **258**: 15130-15134.
  23. Robertson, D. I. y M. J. Poznansky. (1985) The effect of non-receptor mediated uptake of cholesterol on intracellular cholesterol metabolism in human skin fibroblasts. *Biochem. J.* **232**: 553-557.
  24. Slotte, J. P., B. Lundberg, y S. Björkerens. (1984) Intracellular transport and esterification of exchangeable cholesterol in cultured human lung fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*. **793**: 423-428.
  25. Slotte, J. P. y B. Lundberg. (1987) Transfer of [<sup>3</sup>H]cholesterol between lipid vesicles and rat arterial smooth muscle cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*. **750**: 434-439.

26. Rothblat, G. H. y M. C. Phillips. (1982) Mechanism of cholesterol efflux from cells. *J. Biol. Chem.* **257**: 4775-4782.
27. Bellini, F., M. C. Phillips, C. Pickell, y G. H. Rothblat. (1984) Role of the plasma membrane in the mechanism of cholesterol efflux from cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **777**: 209-215.
28. Scallan, T. J., M. V. Srikantiah, B. Seetharam, E. Hansbury, y K. L. Garvey. (1974) Sterol carrier protein hypothesis. *Federation. Proc.* **33**: 1733-1746.
29. Mori, T., T. Tsukamoto, H. Mori, Y. Tashiro, y Y. Fujiki. (1981) Molecular cloning and deduced amino acid sequence of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) of rat liver: A higher molecular mass (60 kDa) protein contains the primary sequence of nonspecific lipid transfer protein as its C-terminal part. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **38**: 4338-4342.
30. Gadella, T. W. J. y K. W. A. Wirtz. (1991) The low-affinity lipid binding site of the non-specific lipid transfer protein. Implications for its mode of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **1070**: 237-245.
31. Rajaram, O. V., G. H. White, y P. J. Barter. (1980) Partial purification and characterization of a triacylglycerol-transfer protein from rabbit serum. *Biochim. Biophys. Acta.* **617**: 383-392.
32. Zilversmit, D. B., L. B. Hughes, y J. Balmer. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* **409**: 393-398.
33. Veerkamp, J. H., R. A. Peeters, y R. G. H. J. Maatman. (1991) Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1081**: 1-24.
34. Nichols, A. V. and L. Smith. (1965) Effect of VLDL on lipid transfer in incubated serum. *J. Lipid. Res.* **6**: 206-210.
35. Morton, R. E. and D. B. Zilversmit. (1983) Inter-relationship of Lipids by the Lipid-transfer Protein Isolated from Human Lipoprotein-deficient Plasma. *J. Biol. Chem.* **258**: 11751-11757.
36. Golmset, J. A. and K. R. Norum. (1973) The metabolic role of lecitin:cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Adv. Lipid. Res.* **1**: 1-65.
37. Marcel, Y. L., C. Vezina, B. Teng, y A. Sniderman. (1980) *Atherosclerosis.* **35**: 127-133.
38. Noël, S. P., R. Dupras, D. Vezina, y Y. L. Marcel. (1984) Comparison of VLDLs isolated from rat liver

- perfusate, rat serum and human plasma as acceptors for cholesteryl ester transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* **796**: 277-284.
39. Eisenberg, S. (1985) Preferential enrichment of large-sized VLDL populations with transferred cholesteryl ester. *J. Lipid. Res.* **26**: 487-494.
40. Ihm, J. D. M. Quinn, S. J. Busch, B. Chataing, y J. A. K. Harmony. (1982) Kinetics of plasma protein-catalyzed exchange of phosphatidylcholine and cholesteryl ester between plasma proteins. *J. Lipid. Res.* **23**: 1328-1341.
41. Sammet, D. y A. R. Tall. (1985) Mechanisms of Enhancement of Cholesteryl transfer Protein Activity by Lipolysis. *J. Biol. Chem.* **260**: 6687-6697.
42. Massey, J. B., D. Hickson-Bick, D. P. Via, A. M. Gotto, y H. J. Pownall. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **835**: 124-131.
43. Abbey, M., S. Bashras, y G. D. Calvert. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **663**: 350-355.
44. Damen, J., J. Regts, y G. Scherphof. (1982) Transfer of [<sup>14</sup>C]Phosphatidylcholine between liposomes and human plasma HDL. *Biochim. Biophys. Acta.* **712**: 444-452.
45. Tall, A. R., S. Krumholz, T. Olivercrona, y R. J. Deckelbaum, (1985) Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange phospholipids between VLDL and HDL during lipolysis. *J. Lipid. Res.* **26**: 842-851.
46. Massey, J. B., D. Hickson, H. A. She, J. T. Sparrow, D. P. Via, A. M. Gotto y H. J. Pownall. (1984) Measurement and prediction of the rate of spontaneous transfer of phospholipids between plasma proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **794**: 274-280.
47. Pownall, H. J., D. L. Hickson, y L. C. Smith. (1983) Transport of biological lipophiles: effect of lipophile structure. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 2440-2445.
48. Massey, J. B., D. Hickson-Bick, D. P. Via, A. M. Gotto, y H. J. Pownall. (1985) Fluorescence assay of the specificity of human plasma and bovine liver phospholipid transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **835**: 124-131.

49. Ortega, A. y J. Mas-Oliva (1984) Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>)-ATPase from cardiac muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **773**: 231-236.
50. Santiago-Garcia, J. y J. Mas-Oliva (1991) A novel cholesterol transfer protein in cardiac sarcolemma. Purification and initial characterization. *Mol. Cell. Biochem.* **100**: 51-59.
51. Drayna, D., A. S. Jarnagin, J. McLean, W. Henzel, W. Kohr, C. Fielding y R. Lawn. (1987) Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature.* **337**: 632-634.
52. Agellon, L. B., E. M. Quinet, T. G. Gillette, D. T. Drayna, M. L. Brown y A. R. Tall (1990) Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry.* **29**: 1372-1376.
53. Jiang, X. C., P. Moulin, E. Quinet, I. J. Goldberg, L. K. Yacoub, L. B. Agellon, D. Compton, R. Schnitzer-Polokoff y A. R. Tall (1991) Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J. Biol. Chem.* **266**: 4631-4639.
54. Faust, R. A. y J. J. Albers (1987) Synthesis and secretion of plasma cholesteryl ester transfer protein by human hepatocarcinoma cell line HepG2. *Arteriosclerosis.* **7**: 267-275.
55. Swenson, T., J. Simmons, C. Hesler, L. Bisgaier y A. R. Tall (1987) Cholesteryl ester transfer protein is secreted by HepG2 cells and contains asparagine-linked carbohydrate and sialic acid *J. Biol. Chem.* **262**: 16271-16274.
56. Faust, R. A. y J. J. Albers (1988) Regulated vectorial secretion of cholesteryl ester transfer protein (LTP-1) by the Ca-Co2 model of human enterocyte epithelium. *J. Biol. Chem.* **263**: 8786-8789.
57. Faust, R. A., M. C. Cheung, y J. J. Albers (1989) Secretion of cholesteryl ester transfer protein-lipoprotein complexes by human HepG2 hepatocytes. *Atherosclerosis.* **77**: 77-82.
58. Faust, R. A., J. H. Tollefson, A. Chait, y J. J. Albers (1990) Regulation of LTP-1 secretion from human monocyte-derived macrophages by differentiation and cholesterol accumulation *in vitro.* *Biochim. Biophys. Acta.* **1042**: 404-409.
59. Pape, M. E., R. G. Ulrich, T. J. Rea, K. R. Marotti y G. W. Melchior (1991) Evidence that nonparenchymal cells of the liver are the principal source of cholesteryl ester transfer protein in primates.

- J. Biol. Chem.* **226**: 12829-12831.
60. Mattox, W. L. Ryner y B. S. Baker (1992) Autoregulation an multifunctionality among *trans*-acting factors that regulate alternative pre-mRNA processing. *J. Biol. Chem.* **267**: 19023-19026
  61. Havel, R. J., H. H. Eder y J. H. Bradgon. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**: 1345-1350.
  62. Goldstein, J. L., S. K. Basu, y M. S. Brown (1983) Receptor mediated endocytosis of low-density lipoproteins in culture cells. *Methods. Enzymol.* **98**: 241-260.
  63. Radding, C. M. y D. Steinberg, (1960) Studies on the synthesis and secretion of serumlipoproteins by rat liver slices. *J. Clin. Invest.* **39**: 1560-1569.
  64. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
  65. Kagawa, Y. y E. Racker. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**: 5477-5487.
  66. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr y R. J. Randall. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  67. Siedel, J. et al (1981) A clinical test for cholesterol determination. *J. Clin. Chem. Biochem.* **66**: 375-
  68. Warnick, G. R. y J. J. Albers. (1978) A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high-density lipoprotein cholesterol. *J. Lipid. Res.* **19**: 65-76.
  69. Merrifield, B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2149 o Letsinger, R. L., J. L. Finnan, G. A. Heavner y W. B. Lundsford. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 3278, o Beaucage, S. L. y M. H. Caruthers (1981) *Tetrahedron Lett* **22**: 1859.
  70. Chirgwin, J. M., A. E. Prybyla, R. J. Mac Donald y W. J. Rutter. (1987) Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods. Enzymol.* **152**: 219
  71. Wang, A. M., M. V. Doyle y D. F. Mark (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* **86**: 9717-9721.
  72. Kawasaki, E. S. y A. M. Wang. (1989) Detection of Gene Expression. En: Erlich, H.A. ed. PCR

- Technology: Principles and Applications of DNA Amplification. Stockton Press, Inc. New York, NY. 89-97.
73. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503
  74. Lange, Y. (1986) en *The Physical Chemistry of Lipids: From alkanes to phospholipids* (Smal, D.M., ed.), pp. 523-554, Plenum Press, New York.
  75. Bernabé, B. y D. B. Zilversmith. (1982) Heterogeneity of Rabbit Intestine Brush Border Plasma Membrane Cholesterol. *J. Biol. Chem.* (257) **13**: 7608-7614.
  76. Quinet, E., A. R. Tall, R. Ramakrishnan y L. Rudel. (1991) Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. *J. Clin. Invest.* **87**: 1559-1566.
  77. Tall, A. R., E. Granot, K. J. Williams, R. Brocia, C. Hesler y M. Denke. (1987) Accelerated transfer of cholesteryl esters in dyslipidemic plasma. *J. Clin. Invest.* **79**: 1217-1225.
  78. Inazu, A., J. Koizumi, H. Mabuchi, K. Kajinami y R. Takeda. (1992) Enhanced cholesteryl ester transfer protein activities and abnormalities of high density lipoproteins in familial hypercholesterolemia. *Horm. Metab. Res.* **24**: 284-288.
  79. Moulin, P., G. B. Appel, H. N. Ginsberg y A. R. Tall. (1992) Increased concentration of plasma cholesteryl ester transfer protein in nephrotic syndrome: role in dyslipidemia. *J. Lipid. Res.* **33**: 1817-1822.
  80. Inazu, A., M. L. Brown, C. B. Hesler, L. B. Agellon, J. Koizumi, K. Takata, Y. Maruhama, H. Mabuchi y A. R. Tall. (1991) Increased high density lipoproteins caused by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1234-1238.
  81. Gold, J. C. y M. C. Phillips. (1990) Effects of membrane lipid composition on the kinetics of cholesterol exchange between lipoproteins and different species of red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1027**: 85-92.
  82. Boggs, J. M. (1980) *Can. J. Biochem.* **58**: 755-770.

83. Van Dijck, P. W. M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta.* **555**: 89-101.
84. Deniel, R. A., J. W. C. M. Jansen, P. W. M. Van Dijck y L. L. M. Decnen. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* **465**: 1-10.
85. Ferrel, J. E., K. J. Lee y W. H. Huestis. (1985) Lipid transfer between phosphatidylcholine vesicles and human erythrocytes exponential decrease in rate with increasing acyl chain length. *Biochemistry.* **24**: 2857-2864.
86. Nichols, J. W y Pagano R. E. (1981) Kinetics of Soluble Lipid Monomer Diffusion between Vesicles. *Biochemistry.* **20**: 2783-2789 y (1982) Use of Resonance Energy Transfer to Study the Kinetics of Amphiphile Transfer between Vesicles. *Biochemistry.* **21**: 1720-1726.
87. Pownall, H. J., D. L. Hickswon y L. C. Smith. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 2440-2445.
88. Aniansson, E. A. G., S. H. Wall, M. Almgren y cols. (1976) *J. Phys. Chem.* **80**: 905-922.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

MEMBRANE BOUND CETP MEDIATES THE TRANSFER OF FREE CHOLESTEROL  
BETWEEN LIPOPROTEINS AND MEMBRANES

Mónica Ruiz-Noriega\*, Ileana Silva-Cárdenas\*, Blanca Delgado-Coello\*, Alejandro  
Zentella-Dehesa\* and Jaime Mas-Oliva<sup>Δ\*</sup>.

\*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-243,  
and \*Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apdo. Postal 70-159, 04510 México, D.F. MEXICO.

<sup>Δ</sup> Corresponding author

\* Part of this work was presented at the 2<sup>nd</sup> IUBMB Conference "Biochemistry of Cell  
Membranes", Bari, Italy, 1993.

## INTRODUCTION

Although lipids undergo spontaneous exchange between membranes, the factors that govern the transmembrane migration of lipids across natural membranes are still poorly understood. Although cholesterol is a quantitatively important component of plasma membranes, few studies have dealt with the phenomena of its dynamics and distribution in mammalian cells. It has been suggested that membrane components such as lipid and protein might modulate this phenomena (1-3). Cell plasma-membranes which contain a large variety of proteins modulate cholesterol packing leading to different cell types having different  $t_{1/2}$  values for cholesterol exchange.

The discovery of lipid exchange proteins has in great measure promoted our knowledge of mediated exchange of lipids. Nevertheless, although the protein mediated exchange process for phospholipids, triacylglycerols, and cholesterol esters has been fairly well described (4-7), a protein system capable of catalyzing free cholesterol exchange until recently has been proposed by us (8). Studies from this laboratory have established the presence of a protein named CHTP (for cholesterol transfer protein) that when reconstituted in artificial membranes mediates cholesterol movement between the bilayer and lipoproteins (CHTP) (8).

CHTP which in many ways resembles a cholesteryl ester transfer protein isolated from plasma (CETP), originally was isolated from cardiac sarcolemma and presents an apparent molecular weight of 73,000. In order to express transfer activity CHTP must be present in the membrane in a multimeric form, since the monomer has been shown not to be active. CETP facilitates the transfer of cholesteryl esters from their site in HDL to the less triglyceride-rich lipoproteins. It is a glycoprotein with a molecular weight of 74,000 in SDS-polyacrylamide gels and presents a high content of hydrophobic residues compared to other plasma proteins (9-10). Based on the suggestion for a local role of CETP in cells and tissues of animals that do not present CETP activity in plasma (11-13) and on our previous observations where we described the presence of CHTP in plasma membrane, the present study was undertaken to examine the possibility that CETP when reconstituted in artificial membrane might express cholesterol transfer activity in a similar fashion as CHTP does.

## MATERIALS AND METHODS

### *Isolation of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP)*

CETP was purified by a combination of ultracentrifugation and sequential chromatography on phenyl-sepharose

(Sigma, Co) and concanavalin A-sepharose (Sigma, Co) (14) with the following modifications.

Lipoprotein-free plasma was isolated by sequential ultracentrifugation from freshly obtained normal human plasma. The  $d=1.21$  g/ml infranatant was recentrifuged at  $d=1.24$  g/ml to eliminate lipoprotein contamination. The  $d=1.24$  g/ml infranatant was applied to a  $2.6 \times 40$  cm column of phenyl-sepharose equilibrated with  $4M$  NaCl/ $10mM$  Tris-Hcl/ $2mM$  EDTA, pH=7.4. Proteins were eluted in three steps with the equilibration buffer, with  $150mM$  NaCl/ $10mM$  Tris-Hcl/ $2mM$  EDTA, pH=7.4, and with distilled water.

Fractions from the phenyl-sepharose eluted with distilled water were pooled, concentrated by Amicon ultrafiltration using a PM-50 membrane, and applied to a  $1.0 \times 10$  cm column of concanavalin A-sepharose equilibrated with  $90mM$  sodium acetate/ $50$  NaCl, pH=4.5.

Unbound proteins were washed out with the equilibration buffer. Adsorbed proteins were eluted with the equilibration buffer plus  $150mM$   $\alpha$ -methyl-D-manoside.

Fractions eluted with this buffer were pooled, concentrated and tested for cholesterol transfer.

The partially purified concanavalin A-sepharose fraction of CETP was used in all experiments.

#### *Preparation of Lipoproteins*

Lipoprotein, LDL and HDL, were prepared from fresh human plasma at densities between  $1.006$ - $1.063$  g/ml, and  $1.091$ - $1.21$  g/ml respectively, by sequential salt density ultracentrifugation using the Beckman L8-55M or L5-75B ultracentrifuges in a Beckman 60 Ti rotor using the method of Havel, Eder, and Bragdon (15). Densities were adjusted with solid KBr. After ultracentrifugation, LDL were dialyzed against a total volume of 12 liters of  $150mM$  NaCl/ $0.24mM$  EDTA, pH=7.4 for 48 h at  $4^{\circ}C$  (two changes of 6 liters each).

HDL was labeled by incubation with [ $^3H$ ]cholesterol (NEN)/ phosphatidylcholine (Sigma, Co) liposomes for 16-20 h at  $4^{\circ}C$ .

#### *Determination of Free Cholesterol Transfer*

The transfer experiments were performed from isolated [ $^3H$ ]cholesterol labeled HDL to small unilamellar PC/C liposomes, which thereafter were separated by precipitation of the liposomes with heparin- $MnCl_2$  as described by Wamick and Albers (16).

[ $^3H$ ]cholesterol labeled HDL were incubated with liposome reconstituted CETP for 3 h at  $37^{\circ}C$  in a final volume of  $450\mu l$  of a buffer containing  $150mM$  NaCl/ $10mM$  Tris-Hcl, pH=7.4.

In a different set of experiments employing the optimum CETP concentration for maximum transfer time course experiments were performed.

The reaction was stopped by addition of an Heparin-Mn<sup>++</sup> solution, standing for 10 min at room temperature. The precipitated was removed by centrifugation for 10 min at 12,000 rpm. The resultant clear supernatant was analyzed for radioactivity and cholesterol transfer was expressed as the percentage of radioactivity determined in the supernatant.

Cholesteryl ester (CE) transfer activity was determined by measurement of the facilitated transfer of [<sup>14</sup>C]-CE from LDL to HDL. [<sup>14</sup>C]-CE transfer was determined after incubation at 37°C for 3h by addition of heparin-Mn<sup>++</sup> to precipitate LDL, then counting the [<sup>14</sup>C]-CE transferred to the HDL remaining in the supernatant.

### *Liposomes*

Liposomes were prepared by mixing cholesterol and phosphatidylcholine in a ratio 8/2 (w/w). The mixture was thoroughly dried under high vacuum after evaporation of the organic solvent under a steam of nitrogen.

5 ml buffer (150mM NaCl/10mM Tris-HCl, pH=7.4) were added to 50 mg and the lipid was dispersed by pulsed sonication with a probe-type sonifier (Branson 250). After removal of probe-derived titanium debris by centrifugation the dispersions were optically clear.

## **RESULTS**

The isolation of CETP in an active form was accomplished by using standard protein purification techniques as previously described (14) and transfer activity assays to determine the ability of individual fractions to transfer esters of cholesterol between LDL and HDL particles. The purification procedure consisted of phenyl-Sepharose and Concanavalin A-Sepharose Chromatography. The active protein eluted from the phenyl-Sepharose column in a broad peak of 280 nm absorption after elution with decreasing ionic strength buffers and distilled water. These fractions were pooled, concentrated and chromatographed on Concanavalin A-Sepharose. The active fraction from this column obtained after elution with methyl-D-mannoside were also pooled, concentrated and analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1). Following elution with 150 mM  $\alpha$  methyl-D-mannoside two bands became apparent, the glycoprotein of M<sub>r</sub> 74,000 and a protein M<sub>r</sub> 53,000 most probably accounting for a N-linked carbohydrate and sialic acid free form of the same protein (Fig. 1).

When purification of the biologically active material was achieved, attention was turned to the reconstitution procedure for CETP. Figure 2 shows that control phosphatidylcholine/cholesterol liposomes in the absence of any protein are good acceptors for (<sup>3</sup>H)-cholesterol mobilized from HDL particles or donor particles. However when the liposomes contain reconstituted CETP an overall stimulation on the transfer process is observed. The insert shows the (<sup>14</sup>C)-cholesterol ester transfer between LDL and HDL particles catalyzed by soluble CETP. Time dependence experiments of (<sup>3</sup>H)cholesterol transferred from HDL particles to control liposomes and CETP reconstituted liposomes are shown in figure 3. It is consistently shown that CETP reconstituted liposomes catalyze the transfer of (<sup>3</sup>H)cholesterol more efficiently than liposomes with no CETP present or cytochrome oxidase reconstituted liposomes as a control for an integral membrane protein not related to the process. These control liposomes show that membrane proteins in general do not mediate the transfer of cholesterol between lipoproteins and membranes.

Employing the aminoacid sequence published by Drayna et al. (1987) for the hepatic form of CETP (10), we synthesized a series of oligonucleotides with specific sequences for different regions of CETP. Six pairs of oligonucleotides with restriction sites in both ends which allowed directional cloning were used in PCR reactions using low stringency hybridization. cDNA was generated by reverse transcription using total RNA isolated from HepG2 cells, followed by PCR reactions.

Two of the six oligonucleotide pairs generated amplification products with the expected size, suggesting a successful amplification of cDNA fragments expressed in HepG2 cells with homology for CETP. Pair 106-204 allowed the amplification of a fragment of approximately 564 bp in all tissues tested. However, pair 104-202 amplified a fragment of approximately 383 bp much more evident than the one obtained for pair 106-204 (figure 4). Hybridization with an internal oligonucleotide to the pair 104-202 gave a positive signal in this southern analysis demonstrating the presence of similar sequences of CETP in HepG2 cells. It is evident that in a similar fashion to tissues known as producers of the plasma form of CETP, the signal observed in tissues like ovary, lung, intestine and heart, that do not contribute in an important way to the pool of plasma CETP, presented an important signal with the cDNA fragments tested.

## DISCUSSION

In the present study we have used reconstitution experiments to investigate CETP as a mediator of

membrane cholesterol exchange. The primary goals were to determine if membrane reconstituted CETP catalyzes the exchange of free cholesterol from lipoproteins to the membrane and to identify underspread tissue distribution of CETP mRNA in response to the apparent pleiotropic functions of CETP in different cells and tissues (11,17). The characterization of CETP like genes in cells and tissues with no capacity to excrete the plasma form of CETP will undoubtedly help to dilucidate the complex phenomena of cholesterol efflux from cells.

Although a variety of cell types have the capacity to secrete CETP or contain CETP mRNA, the physiological significance of this findings is uncertain. In some cases, there seems to exist an interesting discrepancy between the secretion of cholesteryl ester transfer activity and the levels of CETP mRNA. Although HepG2 cells and CaCo2 cells contain the message, the quantitative amount is much less of the native tissues (12,13). since only a few tissues express the plasma form of CETP, including hepatic and adipose tissue synthesis, several cells and tissue types that do not contribute to the plasma CETP pool could synthesize a form of CETP with critical importance in a local environment within the cell or a tissue. With this possibility in mind, a membrane form of CETP might be of importance in the regulation of the cholesterol homeostasis of the plasma membrane and ultimately of different cell types.

Although the occurrence of soluble and membrane-bound non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) has been proposed (18) in this report for the first time it is shown that CETP in a membrane-bound form, which structurally might be closely related to the molecule we originally described and named as CHTP, is capable of mediating the transfer of free cholesterol between membranes and lipoprotein particles.

Our results are consistent with the proposal that proteins with high affinity for cholesterol such as CHTP or reconstituted CETP play an important role in local tissue metabolism of cholesterol. These results showed that CETP mRNA was present in a variety of specific cellular locations, where it could play a local role in the dynamics of cholesterol, for example, enhancing the efflux of cholesterol from the bilayer to lipoproteins. In particular it might be suggested that membrane located CETP facilitates the well supported aqueous diffusion mechanism for monomeric cholesterol (19,20).

Since transfer of lipid molecules from the bilayer to the aqueous phase proceeds through a transition state complex where the lipid molecule is attached to the vesicle by the tip of its hydrophobic tail (19), it is conceivable to propose that the formation of this activated state complex associated with a high energy of activation is lowered

by the presence of CHTP or reconstituted CETP in the donor membrane.

Water miscible organic solvents have been shown to enhance the rate of cholesterol exchange between lipoproteins and membranes (21,22), where the rate of stimulation has been described to description of hydrophobic interactions involving lipids. The presence of cholesterol binding proteins in these membranes might be consistent with a mechanism involving collision complexes independent on the aqueous solubility of cholesterol during exchange. As previously shown by us, it is conceivable that oligomerization could also play an extremely important role in the modulation of the binding constants for cholesterol.

In general terms, species with low levels of plasma CETP are resistant to dietary atherosclerosis (23). Only after the introduction of CETP into rats by injection or into mice by transgenesis (21) results in lipoprotein changes normally associated with the development of atherosclerosis. Nevertheless, local synthesis of CETP within cells involved in the progression of the disease might provide an anti-atherogenesis action (24). The role of CETP in the process is highlighted by the underspread distribution of CETP mRNA and its induction in central and peripheral tissues by increased dietary cholesterol (10,17). This suggests that CETP is a highly regulated component of reverse cholesterol transport with local effects in cells as well as in plasma.

#### ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors wish to thank Dr. Harshini Da Silva for many stimulating discussions at the early stage of this study. The secretarial work of Mrs. Ma. Elena Gutiérrez is gratefully acknowledged. Partially supported by DGAPA-UNAM (grant IN-205093).

#### REFERENCES

1. Tall, A.R. Plasma lipid transfer proteins. (1986) *J. Lipid Res.* **27**: 361-367.
2. Scallan, T. J., M. V. Srikantaiah, B. Seetharam, E. Hansbury, y K. L. Garvey. (1974) Sterol carrier protein hypothesis. *Federation. Proc.* **33**: 1733-1746.
3. Tall, A.R. (1993) Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.* **34**: 1255-1274.
4. Ihm, I., J. L. Ellsworth, B. Chataing, y J. A. Harmony. (1982) Plasma protein-facilitated coupled exchange of Pc & CE in the absence of cholesterol esterification. *J. Biol. Chem.* **257**: 4818-4827.

5. Morton, R. E. y D. B. Zilversmith (1982) Purification and characterization of lipid transfer protein(s) from human lipoprotein deficient plasma. *J. Lipid. Res.* **23**: 1058-1067.
6. Albers, J. J., J. H. Tollefson, C. Chen, y A. Stinmetz (1984) Isolation and characterization of human plasma lipid transfer proteins. *Atherosclerosis.* **4**: 49-58.
7. Tall, A. R., E. Abreu, y J. Shumar. (1983) Separation of a plasma phospholipid transfer protein from cholesterol ester/phospholipid exchange protein. *J. Biol. Chem.* **258**: 2174-2180.
8. Santiago-Garcia, J. y J. Mas-Oliva (1991) A novel cholesterol transfer protein in cardiac sarcolemma. Purification and initial characterization. *Mol. Cell. Biochem.* **100**: 51-59.
9. Agellon, L. B., E. M. Quinet, T. G. Gillette, D. T. Drayna, M. L. Brown y A. R. Tall (1990) Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry.* **29**: 1372-1376.
10. Drayna, D., A. S. Jarnagin, J. McLean, W. Henzel, W. Kohr, C. Fielding y R. Lawn. (1987) Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature.* **337**: 632-634.
11. Faust, R. A. y J. J. Albers (1987) Synthesis and secretion of plasma cholesteryl ester transfer protein by human hepato-carcinoma cell line HepG2. *Arteriosclerosis.* **7**: 267-275.
12. Faust, R. A. y J. J. Albers (1988) Regulated vectorial secretion of cholesteryl ester transfer protein (LTP-1) by the Ca-Co2 model of human enterocyte epithelium. *J. Biol. Chem.* **263**: 8786-8789.
13. Faust, R. A., M. C. Cheung, y J. J. Albers (1989) Secretion of cholesteryl ester transfer protein-lipoprotein complexes by human HepG2 hepatocytes. *Atherosclerosis.* **77**: 77-82.
14. Pattnaik, N. M., A. Montes, L. B. Hughes, y D. B. Zilversmith (1978) Cholesteryl ester exchange protein in human plasma. Isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* **530**: 428-438.
15. Havel, R. J., H. H. Eder y J. H. Bradgon. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**: 1345-1350.
16. Warnick, G. R. y J. J. Albers. (1978) A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high-density lipoprotein cholesterol. *J. Lipid. Res.* **19**: 65-76.
17. Jiang, X. C., P. Moulin, E. Quinet, I. J. Goldberg, L. K. Yacoub, L. B. Agellon, D. Compton, R. Schnitzer-Polokoff y A. R. Tall (1991) Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J. Biol. Chem.* **266**: 4631-4639.

18. Mori, T., T. Tsukamoto, H. Mori, Y. Tashiro, y Y. Fujiki. (1981) Molecular cloning and deduced aminoacid sequence of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) of rat liver: A higher molecular mass (60 kDa) protein contains the primary sequence of nonspecific lipid transfer protein as its C-terminal part. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **38**: 4338-4342.
19. McLean, L. R. y M. C. Phillips. (1981) Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry.* **20**: 2893-2900.
20. Phillips, M. C., W. J. Johnson, y G.H. Rothblat. (1987) Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* **906**: 223-276.
21. Pattnaik, N. M. y D. B. Zilversmit. (1979) Interaction of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **254**: 2782-2786.
22. Bruckdorfer, K. R., J. Crowe, y M. K. Sherry. (1984) Evidence for a water-soluble intermediate in exchange of cholesterol between membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **778**: 489-496.
23. Radding, C. M. y D. Steinberg. (1960) Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J. Clin. Invest.* **39**: 1560-1569.
24. Quinet, E., A. R. Tall, R. Ramakrishnan y L. Rudel. (1991) Plasma lipid transfer protein as a determinant if the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. *J. Clin. Invest.* **87**: 1559-1566.

## FIGURES

- Fig. 1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of fractions obtained from phenyl-Sepharose: a) molecular weight markers, b) 4M NaCl/10 mM Tris-HCl/2 mM EDTA, pH 7.4, c) 150 mM NaCl/10 mM Tris-HCl/2 mM EDTA, pH 7.4, d) distilled water, e) distilled water (second peak) and Concanavalin A-Sepharose: f) 50 mM NaCl/90 mM sodium acetate/150 mM, and g) 50 mM NaCl/90 mM sodium acetate/150 mM  $\alpha$ -methyl-D-mannoside, pH 4.5.
- Fig. 2 Concentration dependence of [ $^3$ H]cholesterol transferred from HDL to control liposomes ( $\bullet$ ), and liposomes reconstituted CETP ( $\circ$ ).
- Fig. 3 Time dependence of [ $^3$ H]cholesterol transferred from HDL to control liposomes ( $\bullet$ ), liposome reconstituted CETP ( $\circ$ ), and liposomes reconstituted cytochrome oxidase ( $\Delta$ ).
- Fig. 4 Amplification products of low stringency PCR using CETP specific oligonucleotides. cDNA was prepared from total RNA isolated from different cell lines and tissues: HepG2 (B), ovary (C), lung (D), intestine (E), heart (F), AS-30D (G), and liver (H). The utilized oligonucleotides predicted a CETP specific amplification product of 395 bp, as the one recognized in HepG2 cells, lane B. Controls include a 308 bp product of IL-1, lane I, CETP specific oligos in the absence of template, lane J and molecular weight markers, lanes A and K.

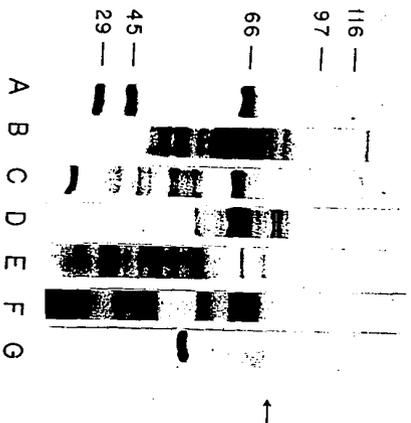


Fig 1

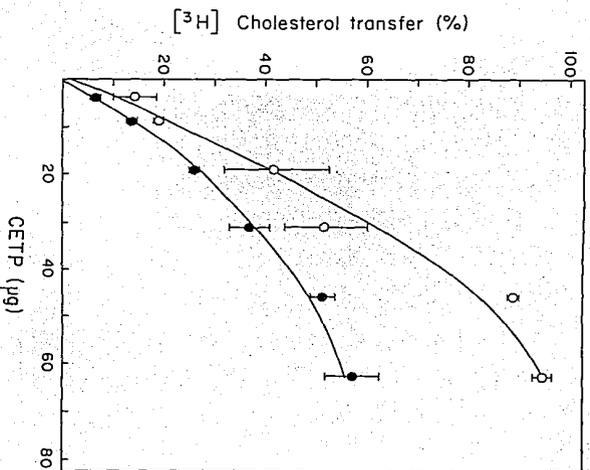


Fig 2

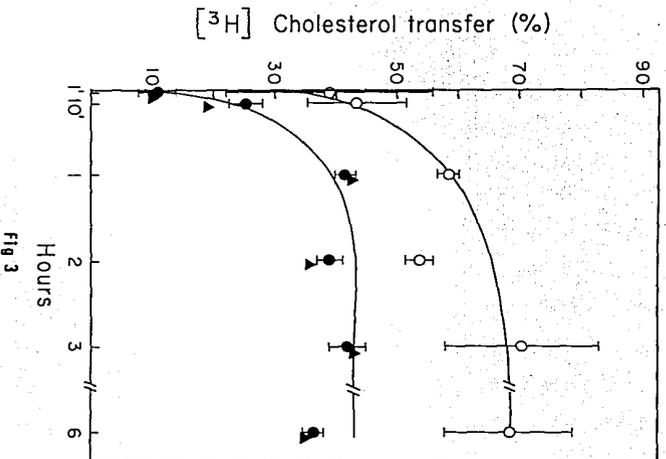


Fig 3

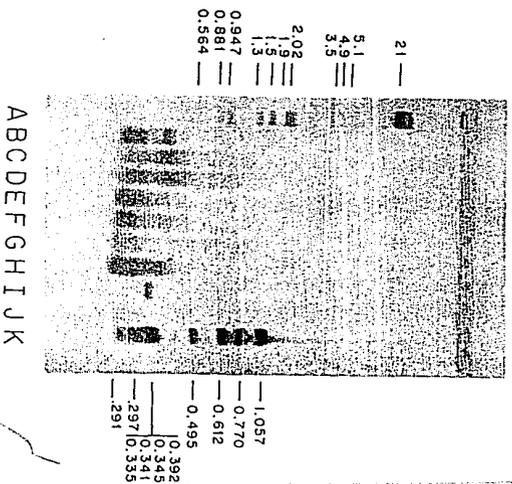


Fig 4