



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA
LECTINA COLESTEROL
ACILTRANSFERASA POR PÉPTIDOS
DERIVADOS DE APOLIPOPROTEÍNAS
HUMANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A

**Q. F. B. SANDRA LUZ
AGUILAR ESPINOSA**

Tutor: Dr. Jaime Mas Oliva

MÉXICO, D.F

2011.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Reconocimientos

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Jaime Mas Oliva, en el laboratorio 322 del edificio norte en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce el invaluable apoyo académico del Comité Tutoral que se encargó de asesorar el desarrollo de esta tesis. Dicho Comité estuvo conformado por:

Dr. Jaime Mas Oliva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Edgar Vázquez Contreras	Universidad Autónoma Metropolitana

Se reconoce la asesoría, invaluable ayuda y apoyo técnico de la Maestra en Ciencias Blanca Alicia Delgado Coello durante la realización de este proyecto.

Se reconoce la asesoría e invaluable ayuda de la Dra. Deyanira Fuentes Silva en el diseño y desarrollo del protocolo de aislamiento de proteínas.

Se reconoce la invaluable ayuda y apoyo secretarial brindado por Maria Elena Gutiérrez Robles y Gabriela Valdés Silva.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), a través del donativo 47333/A-1 y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM, México) a través del donativo IN228607/20. Este estudio de maestría fue apoyado con una beca para estudios de posgrado de tiempo completo otorgada por CONACYT.

Un especial reconocimiento al jurado de Examen de Maestría por sus valiosas aportaciones a este trabajo de tesis. El jurado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dr. Armando Tovar Palacio	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Secretario	Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros	Instituto de Química
Suplente	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química
Suplente	Dr. Samuel Canizales Quintero	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Agradecimientos

A **Dios** por ser la luz que guía mi camino. Por ser la fuerza que me impulsa a seguir luchando cada día para enfrentar y vencer los retos de la vida sin perder la esperanza de que es posible llegar a ser y hacer maravillas en este mundo.

A **mis padres** por ser los pilares de esta edificación y aportar a la misma lo mejor que han tenido de sí. A mi padre por darme su cariño, libertad y apoyo. A mi madre por darme toda su confianza, amor, ternura y cuidados incondicionales.

A **mis hermanos Paty y Sergio** por ser mis mejores amigos y compañeros. Los únicos seres que han recorrido a mi lado gran parte de mi paso por este mundo brindándome todo su cariño, apoyo y confianza... no tengo más palabras que puedan describir lo afortunada que soy por recorrer esta travesía al lado de ustedes.

A la **UNAM**, mi amada casa de estudios a la que me honra pertenecer y que me abrió las puertas del conocimiento, dándome la oportunidad de saber lo que es amar a la ciencia, al trabajo y a mi país. Este éxito le pertenece.

Al **Dr. Jaime Mas Oliva**, por haberme brindado desde un principio todo su apoyo y confianza. Porque como buen maestro, además de guiarme en el camino de la ciencia, me motivó siempre con entusiasmo a aprender de la vida. Por ser un gran ejemplo a seguir. Por su paciencia y valiosos consejos, gracias.

A **Deyanira Fuentes y Blanca Delgado** porque además de haber sido un apoyo académico invaluable en el desarrollo de este proyecto, siempre me dieron su confianza, apoyo y afecto sincero.

A **Genaro Vázquez** por haber sido una parte tan importante en esta etapa de mi vida. Por su cariño, consejos y apoyo. Todo mi cariño, admiración y agradecimiento.

A los integrantes del **laboratorio 322-Norte**: Sra. Lupita, Paola Mendoza, Danaí, Salvador, Víctor, Enrique, Luis Pablo, Paola Ibelles, Ernesto y Armando. A ellos que fueron mis compañeros con los cuáles hice todo este recorrido por el mundo de la bioquímica compartiendo nuestro tiempo, espacio, trabajo, nuestras preocupaciones y nuestros triunfos. A todos gracias.

A **todos mis amigos**. A los de siempre de la Facultad de Química que hasta el día de hoy están conmigo y que también en esta etapa me brindaron su amistad incondicional. A esas mis "chochas" Sandra, Sonia, Angélica, Bety, Alejandra y Silvia. A mis buenos amigos Alejandro, Juan, Salo, Abi, Karla, Ixtla y José de la Rosa. Y a esas niñas que aunque no llegaron a tiempo al mejor equipo de fut de la generación 2002, también son grandiosas: Nieves y Natllely. A todos porque me han demostrado lo hermoso de ese sentimiento llamado amistad, que nada cobra y todo da, sin importar el tiempo ni la distancia.

Un pensamiento

*¿Este es el fin? –
Preguntaba el aprendiz a su maestro.*

*“El fin no existe” - contestó éste.
Siempre habrá algo por descubrir
Siempre habrá algo con qué soñar.*

*Sólo nunca olvides que pasará
y que sólo así frutos dará.
No lo poseas o lo ahogarás.
Este es un grano de arena más,
pero uno más uno han sostenido a la mar.*

*¿Y eso será suficiente? –
Preguntó el aprendiz nuevamente.*

*Será siempre lo necesario
Tan sólo lo que tengas en tus manos
Tan sólo lo que permita tu corazón
Si así lo hicieras, de sobra siempre habrá*

*Pero maestro
¿Qué debo hacer para no caer?*

*Sólo no dejes de ser
Sólo da en espíritu y en verdad*

*Así entenderás que el fin no existe
Tan solo somos viento y somos mar
Somos la flor que debería ser hecha para contemplar
Y estas palabras aún cuando escritas desaparecerán
En tu memoria y en tus actos quedarán*

¿Aquí termina tu consejo maestro?

*No mi querido aprendiz –
contestó amorosamente el maestro –.
Es aquí donde inicia.*

Abreviaturas

- ABCA 1 = Cartucho de unión a ATP tipo 1 (*ATP Binding Cassette type 1*)
- Apo = Apolipoproteína
- BSA = Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- C = Colesterol
- CE = Éster de colesterol (*Cholesteryl Ester*)
- Da = Dalton
- DC= Dicroísmo Circular
- CETP = Proteína Transportadora de Ésteres de colesterol (*Cholesterol Ester Transfer Protein*)
- HDL = Lipoproteína de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)
- HSA = Albúmina de Suero humano (*Human Serum Albumin*)
- IDL = Lipoproteína de Densidad Intermedia (*Intermediate Density Lipoprotein*)
- IP = Inmunoprecipitación
- kDa = KiloDalton
- λ = Longitud de onda
- LCAT = Lecitina Colesterol Aciltransferasa (*Lecithin Cholesterol Acyltransferase*)
- LDL = Lipoproteína de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*)
- Liso-C₁₂PC = Lauril-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfolina
- LPL = Lipoproteína Lipasa
- μ H= Momento hidrofóbico
- PC = Fosfatidilcolina (*Phosphatidylcholine*) o Lecitina
- pI = Punto isoeléctrico
- PM = Peso molecular
- TG = Triglicérido
- TRC = Transporte Reverso del Colesterol
- SDS-PAGE = Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
- SR-B1 = Receptor pepenador clase B 1 (*Scavenger Receptor class B 1*)
- VLDL = Lipoproteína de muy baja densidad (*Very Low Density Lipoprotein*)
- WB = Inmunotransferencia tipo Western (*Western Blot*)

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen.....	1
I. Introducción.....	3
1.1. Transporte de lípidos en el torrente sanguíneo	3
1.2. Reacción de la Lecitina Colesterol Aciltransferasa	7
1.3. Estructura y propiedades de LCAT	10
1.4. Propiedades estructurales de la Apolipoproteína AI	15
1.5. Activación de LCAT por la Apolipoproteína AI: Importancia de las transiciones desorden-orden	17
II. Planteamiento del problema.....	22
III. Hipótesis.....	23
IV. Objetivos.....	24
V. Materiales y métodos.....	25
5.1. Síntesis de los péptidos derivados de Apo AI y análisis de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales	25
5.2. Reconstitución de los péptidos DRV, KLL y VLES	27
5.2.1. Ensayos con los péptidos reconstituidos en un medio hidrofílico	27

5.2.2. Ensayos con los péptidos reconstituidos en un medio lipídico	28
5.3. Estimación del contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI por Dicroísmo Circular (DC)	29
5.4. Determinación de la actividad de LCAT en plasma humano	32
5.5. Purificación de LCAT: Método final	36
5.6. Ensayos analíticos para la identificación de LCAT	37
VI. Resultados y Discusión.....	40
6.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos derivados de Apo AI: DRV, KLL y VLES	40
6.2. Efecto de los péptidos derivados de Apo AI con diferente tipo de estructuración sobre la actividad de LCAT en plasma	43
6.2.1. Determinación del contenido de estructura secundaria de los péptidos DRV, KLL y VLES en medio hidrofílico: Efecto sobre la actividad de LCAT	43
6.2.2. Determinación del contenido de estructura secundaria de los péptidos DRV, KLL y VLES en concentraciones variables tanto de péptido como de Liso-C ₁₂ PC: Efecto sobre la actividad de LCAT	54
6.2.3. Determinación del contenido de estructura secundaria de los péptidos DRV, KLL y VLES a diferentes concentraciones en Liso-C ₁₂ PC 30 mM: Efecto sobre la actividad de LCAT	60
6.3. Purificación de LCAT: Método final	68
6.3.1. Determinación de la actividad de LCAT en una fracción enriquecida en presencia de los péptidos derivados de Apo AI	78
VII. Conclusiones.....	81

VIII. Perspectivas.....	82
IX. Referencias.....	83
X. Apéndices.....	91
10.1. Apéndice 1. Resumen de las propiedades de la Apolipoproteína AI en diferentes niveles de organización	91
10.2. Apéndice 2. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI disueltos en PBS pH 7.4, determinado con el programa CDPro en dos diferentes intervalos de longitud de onda	92
10.3. Apéndice 3. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI reconstituídos en diferentes concentraciones de Liso-C ₁₂ PC, determinado con el programa CDPro en dos diferentes intervalos de longitud de onda	93
10.4. Apéndice 4. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI reconstituídos en Liso-C ₁₂ PC 30 mM, determinado con el programa CDPro en dos diferentes intervalos de longitud de onda	94
10.5. Apéndice 5. Resultados de los diversos protocolos probados para aislar LCAT a partir de plasma humano	95

Resumen

La Lecitina Colesterol Aciltransferasa (LCAT) es una enzima que cataliza la formación de la mayor parte del éster de colesterol plasmático en humanos mediante la transferencia de un grupo acilo graso de la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina al grupo 3- β -hidroxilo del colesterol, dando como productos lisofosfatidilcolina y un éster de colesterol que es transferido al núcleo de la lipoproteína de alta densidad (HDL). La LCAT se encarga de regular la transformación de esta partícula de una forma discoidal a una esférica madura, paso clave en el Transporte Reverso del Colesterol. La Apolipoproteína AI (Apo AI) ha sido identificada como el principal activador de LCAT. Aún cuando su mecanismo de acción no ha sido del todo elucidado, nuestro laboratorio ha propuesto que es dependiente de la presión lateral al que el sistema está sometido y de los cambios conformacionales de tipo desorden-orden que sufren segmentos específicos de las Apos. En el presente trabajo se evaluó el cambio de actividad de LCAT en presencia de péptidos derivados de la Apo AI en diferentes conformaciones. Los péptidos estudiados fueron: DRV (9-24) de la región amino terminal, KLL (45-63) de la región inicial central y VLES (221-239) de la carboxilo terminal de la Apo AI. Experimentos de dicroísmo circular (DC) mostraron que en PBS pH 7.4 los tres péptidos se encuentran desestructurados y que conforme su concentración aumenta, también lo hace su porcentaje de estructuras β y al azar. En cuanto a su efecto sobre la reacción de LCAT los péptidos presentaron un aumento en la actividad de la enzima evaluada en términos del cambio en la velocidad inicial de la reacción y de la formación máxima de producto. Estos cambios fueron dependientes de su concentración: a 0.3 mg/mL VLES fue el que presentó un mayor porcentaje de aumento en la formación de producto, mientras que a 0.6 mg/mL DRV fue el que lo hizo. Para evaluar el efecto de los péptidos estructurados en hélice α , éstos se reconstituyeron con Lauril-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (Liso-C₁₂-PC) en diferentes condiciones de concentración tanto de lípido como de péptido. Los resultados de DC mostraron que aún manteniendo una proporción péptido:lípido constante (1:200), al aumentar la concentración de las preparaciones, la estructura hélice α se pierde y aumenta el porcentaje de

estructuras β y al azar de los péptidos. En estas condiciones la actividad de LCAT disminuye drásticamente hasta abatirse por completo, manteniéndose tan sólo a una concentración de péptido de 0.3 mg/mL en Liso-C₁₂-PC 30 mM. Con el fin de saber si este abatimiento de la reacción era debido a la presencia del lípido o del péptido, se hicieron experimentos de DC y de actividad variando sólo la concentración del péptido y manteniendo constante la concentración del Liso-C₁₂-PC a 30 mM. Los resultados de DC mostraron que esta concentración de lípido fue adecuada para mantener a los tres péptidos estructurados en hélice α y que tal como en el ensayo anterior, dicha estructuración se fue perdiendo conforme se aumentó la concentración del péptido. También bajo estas condiciones DRV fue el que presentó un mayor porcentaje de hélice α , siguiéndole VLES con un comportamiento muy similar. Los resultados de actividad demostraron que el abatimiento de la reacción de LCAT observado inicialmente, es debido al aumento de la concentración del Liso-C₁₂-PC y que el aumento de la concentración del péptido tiene efectos diferenciales dependientes tanto del tipo de péptido como de su concentración. El mayor efecto activador de la reacción se presentó con VLES a una concentración de 0.3 mg/mL, siguiéndole DRV a 0.6 mg/mL, ambos en Liso-C₁₂-PC 30 mM. Comparando los ensayos en medio acuoso con los de medio lipídico, es claro que los péptidos estructurados en hélice α tienen el mismo efecto activador que cuando se probaron desordenados en el sistema de ensayo. Estos resultados sugieren que los péptidos inicialmente desordenados sufren una transición desorden-orden una vez que forman parte del sistema de ensayo (plasma) y se asocian con lípidos plasmáticos, incrementando así la eficiencia de la reacción de LCAT tal como lo hacen en sistemas donde son previamente estructurados en hélice α . DRV y VLES presentan el mayor efecto activador de LCAT en plasma bajo condiciones específicas de concentración en las que son capaces de mantenerse en hélice α . Ensayos con LCAT purificada en sistemas con una composición definida de lípido y péptidos activadores en diversas conformaciones, permitirían obtener información más precisa acerca del mecanismo molecular que gobierna la activación de LCAT por péptidos derivados de Apos humanas.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Transporte de lípidos en el torrente sanguíneo

Debido a su alta insolubilidad en agua, los lípidos son transportados en el torrente sanguíneo como componentes de lipoproteínas, partículas micelares globulares conformadas por un núcleo no polar de triacilgliceroles y ésteres de colesterol rodeadas por una cubierta anfifílica de fosfolípidos y proteínas conocidas como Apolipoproteínas (Apos). Estas partículas se encargan de transportar los lípidos de un tejido a otro con el fin de satisfacer las necesidades lipídicas de las diferentes células. Las regiones protéicas de las lipoproteínas proporcionan un medio idóneo para solubilizar las partículas de lípido manteniendo su integridad estructural y confiriéndoles la especificidad para ser reconocidas y regular así su metabolismo y función. Existen varios tipos de lipoproteínas clasificadas con base en su composición química, propiedades físicas y funciones metabólicas. Dada la diferencia en composición, la relación lípido/proteína cambia y por tanto, la densidad de cada una de estas partículas. De menor a mayor densidad estas son llamadas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Conforme la densidad aumenta, tanto el tamaño de partícula como la relación lípido/proteína disminuyen (Tabla 1-1) (Gurr y Harwood,1991).

A lo largo del proceso del transporte de lípidos, las diferentes lipoproteínas experimentan transformaciones consecutivas de acuerdo con su papel en el metabolismo. Dichas transformaciones inician después del consumo de grasas en la dieta cuando los triacilgliceroles (TGs) de las lipoproteínas son transportados en el torrente sanguíneo en forma de quilomicrones. Los TGs son hidrolizados por acción de la enzima Lipoproteína Lipasa (LPL) cuyo principal activador es la Apo CII. El resultado de esta lipólisis es la liberación de ácidos grasos y de remanentes de quilomicrones, los cuales a su vez son internalizados y degradados en el interior de los hepatocitos. Como los quilomicrones, las VLDL transportan TGs pero de origen endógeno. Estas

lipoproteínas son sintetizadas en el hígado teniendo como componentes protéicos a la Apo B-100 y Apo E. Además de TGs, las VLDL también son capaces de liberar vitaminas liposolubles a diversos tejidos dependiendo de los requerimientos de éstos. Durante este proceso, las VLDL son gradualmente degradadas por acción de la LPL hasta remanentes de VLDL también llamados lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) (German *et al*, 2006). Después de una serie de pasos de degradación, estas lipoproteínas van perdiendo TGs y Apo E hasta formar LDL, partículas ricas en colesterol y fosfolípidos cuya proteína constitutiva es la Apo B-100. Las LDL son consideradas los acarreadores primarios de colesterol en plasma. Su principal función es la de transportar el colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos en un proceso mediado por receptor (Gurr y Harwood,1991). De entre todas las lipoproteínas las HDL son las partículas que presentan una mayor heterogeneidad en tamaño, densidad y composición, debido a que su metabolismo involucra una sofisticada dinámica de autorregulación así como de un continuo equilibrio con el resto de las lipoproteínas (Wang y Briggs, 2004). La principal función de las HDL, es la de transportar el exceso de colesterol de los tejidos periféricos (extrahepáticos) hacia el hígado para su excreción como sales biliares en un proceso denominado “Transporte Reverso del Colesterol” (TRC) (Jonas, 2000).

Tabla 1-1. Composición y características generales de las principales lipoproteínas de plasma humano.

	Quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
% Proteína*	2	7	20	50
% Triacilgliceroles*	83	50	10	8
% Colesterol* ^ξ	8	22	48	20
% Fosfolípidos*	7	20	22	22
Masa total (Daltons)	0.4-30 x 10 ⁶	10-100 x 10 ⁶	2-3.5 x 10 ⁶	1.75-3.6 x 10 ⁵
Densidad (g/mL)	> 0.95	0.95-1.006	1.019-1.063	1.063-1.210
Diámetro (nm)	> 70	30-90	18-22	5-12
Apolipoproteínas principales	AI, B48, CI, CII, CIII	B-100, E	B-100	AI, AII

*Porcentaje calculado con respecto a la masa total de la partícula. ^ξCorresponde a la suma de colesterol libre más colesterol esterificado. Tomada de Gurr y Harwood,1991.

El TRC se encarga de regular la maduración de las HDL, cuyo principal sitio de formación es el hígado. En una etapa temprana, las HDL se encuentran en una forma discoidal naciente (pre- β HDL) que consiste principalmente en una bicapa de fosfatidilcolina asociada con Apo AI en las márgenes del disco. Esta forma de HDL, también llamada Apo AI pobre en lípido, está involucrada en la eliminación de colesterol y fosfolípidos de los tejidos periféricos. Esta transferencia de lípidos de las membranas celulares a las HDL (eflujo de colesterol y fosfolípidos) es mediado por el transportador de membrana *miembro 1 del cassette de unión a ATP* (ABCA 1), regulador importante del TRC durante la etapa de lipidación de la Apo AI pobre en lípido.

Después de su excreción al plasma, las HDL adquieren componentes superficiales adicionales como son fosfolípidos, colesterol y Apos transferidas por los quilomicrones y VLDL durante su catabolismo debido a la acción de la LPL. El colesterol libre de la HDL es después esterificado por acción de la enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) cuyo principal activador es la Apo AI, principal componente protéico de la HDL. De esta forma, las HDL discoidales incrementan su tamaño a medida que acumulan ésteres de colesterol en su núcleo. Esta redistribución de lípido en las partículas de HDL, induce su cambio de una forma discoidal a una forma esférica de HDL madura. La forma esférica de HDL o HDL₃, aumenta su tamaño a una forma más grande HDL₂ conforme captura más colesterol celular que subsecuentemente es esterificado por LCAT. El exceso de ésteres de colesterol de las HDL₂ generados por la reacción de LCAT en plasma, es posteriormente intercambiado por TGs con las VLDL y la subclase ligera de LDL (LDL₁) (Guerin *et al*, 1994) mediante la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP). Por su parte, las HDL₃ son capaces de aceptar más colesterol libre y fosfolípidos que derivan de la acción de la LPL sobre las VLDL en un proceso facilitado por la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP). La degradación de las HDL₃ tiene lugar en el hígado por acción de hidrólisis de la lipasa hepática sobre sus TGs, y se lleva a cabo después de la absorción selectiva de ésteres de colesterol mediada por el receptor pepenador clase B 1 (SR-B1) (Wang y Briggs, 2004) (Fig. 1-1).

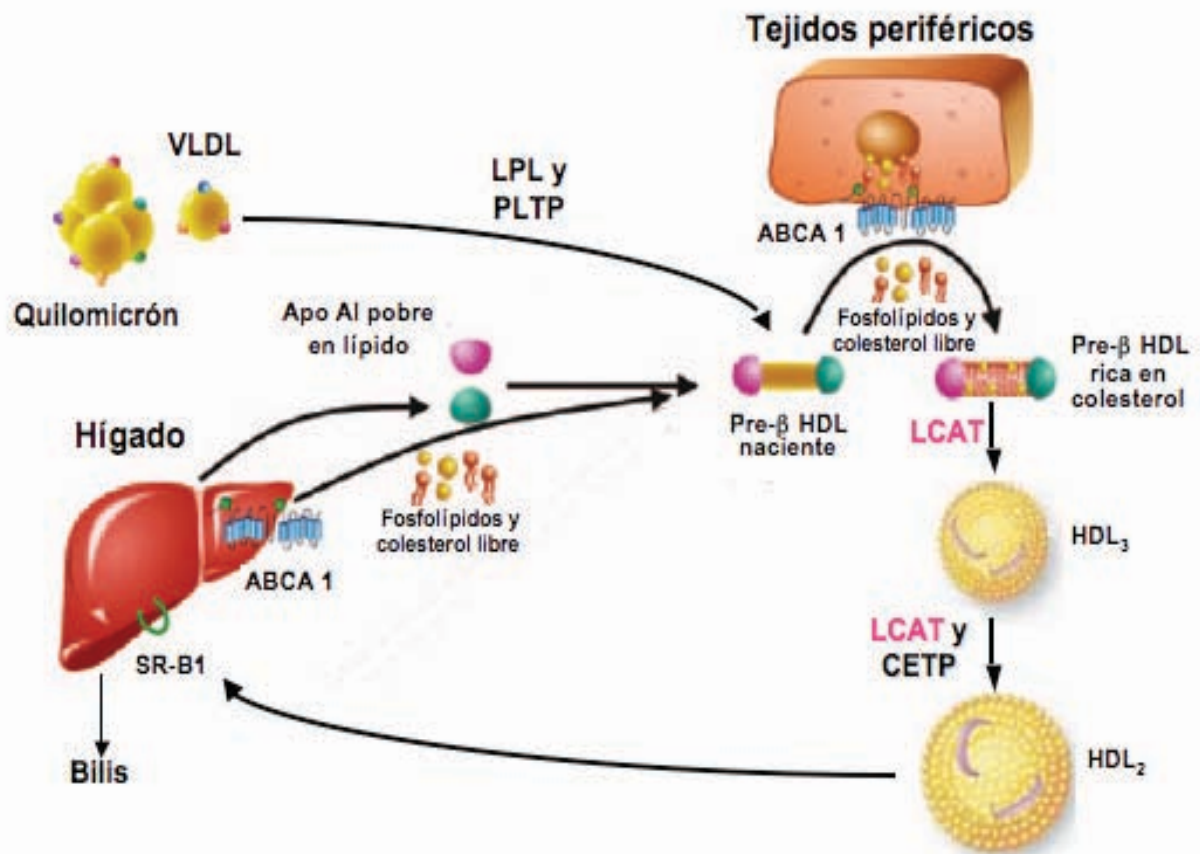


Fig. 1-1. Transporte reverso de colesterol y maduración de las HDL por acción de LCAT.
Adaptada de Lewis y Rader, 2005.

Con respecto a la relevancia médica de este proceso, cabe mencionar que los niveles de colesterol en plasma son un factor importante en el desarrollo de la aterosclerosis, enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias (Lusis, 2000). La regulación de estos niveles es un proceso complicado que involucra la absorción, biosíntesis, transporte, metabolismo y secreción del colesterol. Tal como se ha mencionado, el TRC es una vía que transporta colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado para su excreción y por tanto, es un proceso que puede prevenir la aterosclerosis mediante la reducción de la acumulación de colesterol en la pared de las arterias. Asimismo, el eflujo de colesterol que forma parte del TRC, es el principal proceso por el cual los macrófagos de las paredes arteriales secretan colesterol fuera de las células. Diversos estudios han mostrado que los bajos niveles de HDL₂ y HDL₃ están asociados con el incremento en el progreso de la aterosclerosis y el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Salonen *et al*, 1991).

Como parte del TRC, diversos elementos son considerados como ateroprotectores, entre ellos están: las HDL, la Apo A1 como su principal componente protéico y la LCAT, enzima clave del proceso encargada de la maduración de dichas lipoproteínas. Dado que la HDL y la Apo A1 son los principales receptores de colesterol en el eflujo del colesterol, el incremento de los niveles de HDL puede a su vez aumentar tal eflujo y por tanto el TRC, contribuyendo a la reducción de los riesgos de enfermedad cardiovascular (Ohashi, 2005). Por su parte, la función ateroprotectora de LCAT se debe a que esta enzima favorece la creación de un gradiente del flujo de colesterol desde las células periféricas hacia el plasma mediante la remodelación de la HDL con la subsecuente formación y eliminación de ésteres de colesterol a través de dichas lipoproteínas. La ausencia de LCAT o la deficiencia de su actividad en plasma causa diversas alteraciones metabólicas asociadas a dos deficiencias genéticas conocidas como la “Deficiencia Familiar de LCAT” FLD (*Familial LCAT Deficiency*) y la “Enfermedad de Ojo de Pez” FED (*Fish Eye Disease*). En la FLD la LCAT está presente en concentraciones bajas o indetectables en plasma y es incapaz de esterificar colesterol tanto sobre LDL (actividad β) como sobre HDL (actividad α). Esta deficiencia causa patrones anormales en las lipoproteínas, una notable disminución de ésteres de colesterol en éstas y estructuras atípicas de eritrocitos. Sus manifestaciones clínicas son opacidad corneal, anemia, proteinuria y enfermedad renal. La FED es un desorden que tiene un defecto asociado a la actividad α de LCAT y es caracterizada por una pronunciada opacidad corneal y reducción del colesterol asociado a la HDL (HDL-C) (Jonas, 2000; Eckardstein, 2006).

1.2. Reacción de la Lecitina Colesterol Aciltransferasa

La LCAT es una glicoproteína que cataliza la formación de la mayor parte del éster de colesterol plasmático en humanos mediante la transferencia de un grupo acilo graso de cadena larga de la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina o lecitina (PC), al grupo 3- β -hidroxilo del colesterol, dando como productos lisofosfatidilcolina o lisolecitina (lisoPC) y un éster de colesterol (CE) que es transferido al núcleo de la HDL (Glomset, 1968) (Fig. 1-2).

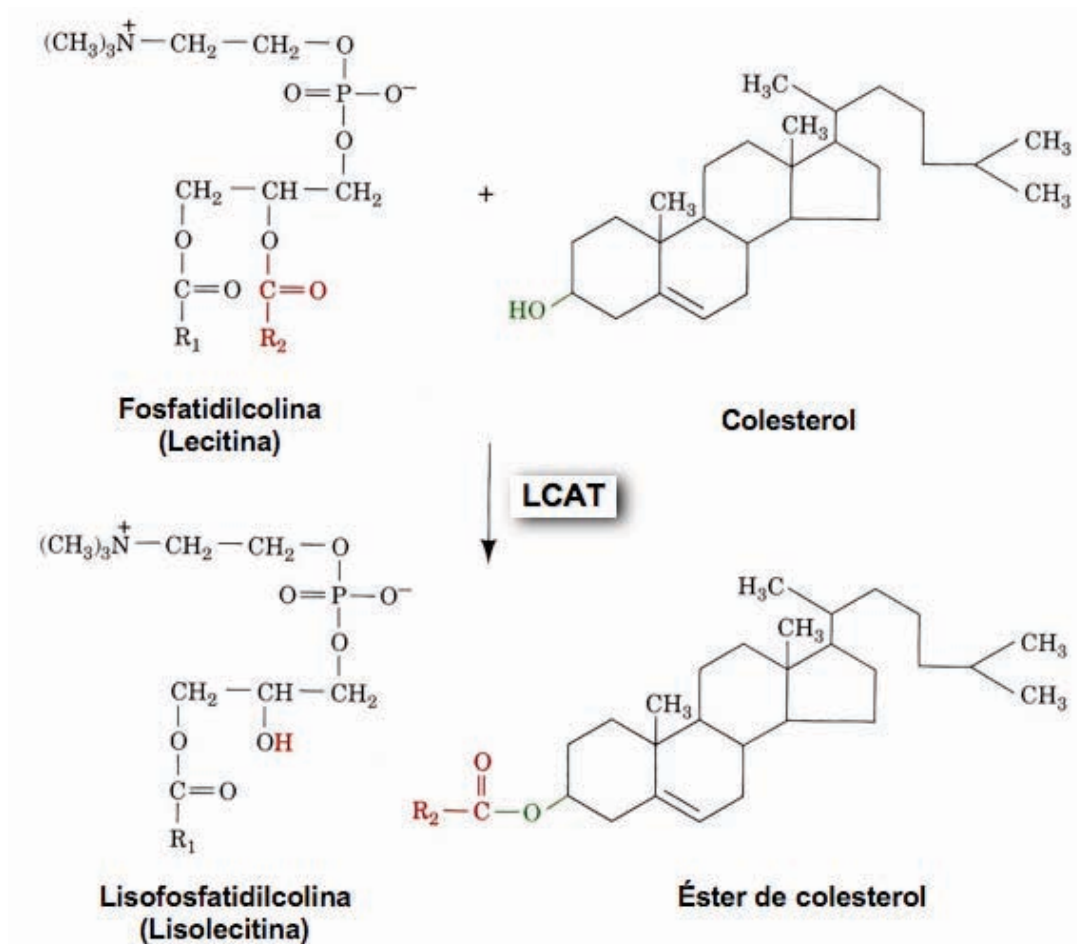


Fig. 1-2. Reacción catalizada por la enzima Lecitina Colesterol Aciltransferasa (LCAT)

La enzima LCAT al igual que numerosas lipasas y fosfolipasas, es una proteína soluble en agua que realiza su actividad catalítica sobre agregados de lípidos. La reacción de LCAT ocurre predominantemente en las HDL, partículas que contienen a la Apo AI, principal activador de la enzima. El primer paso de la reacción es la unión de LCAT a la superficie de una pequeña subfracción de pre- β HDL (Fielding y Fielding, 1995). El colesterol es entonces esterificado por LCAT la cual prácticamente lo atrapa en las HDL en forma de ésteres de colesterol propiciado la maduración de esta partícula. La reacción ocurre en la superficie de la HDL e involucra los siguientes pasos: 1) Unión de la enzima a la superficie de lipoproteína. 2) Activación de la enzima por la Apo AI, el principal cofactor activador de LCAT. 3) Unión de PC al sitio activo de LCAT. 4) Formación de la enzima acilada por transferencia de una cadena de acilo de la PC al aminoácido Ser₁₈₁ de LCAT con liberación de lisoPC. 5) Unión del

colesterol al sitio activo de LCAT. 6) Transferencia del acilo al grupo 3- β -hidroxilo del colesterol para formar el CE correspondiente y 7) Liberación del CE y de la enzima (Jonas, 2000) (Fig. 1-3). La distribución de LCAT sobre las lipoproteínas plasmáticas está estrechamente relacionada con la relativa afinidad de la enzima por éstas y sus respectivas concentraciones de fosfolípidos. Dado que la concentración de fosfolípidos en las LDL es aproximadamente la mitad de la de las HDL, la afinidad de LCAT es de 2.5 a 4 veces menor para LDL respecto a la HDL. Así, la mayor parte de la enzima está presente en complejos con HDL mientras que menos del 20% de LCAT asociada a lipoproteínas, puede esperarse se encuentre en LDL (Jonas, 1998).

En ausencia de un esteroles aceptor apropiado, LCAT puede presentar actividad de fosfolipasa A_2 o de esterasa, liberando ácidos grasos al medio (Fielding y Collet, 1991). Asimismo, LCAT puede transferir grupos acilo grasos a diversos alcoholes, incluyendo varios esteroides. Por otro lado, cuando las concentraciones de lisolecitina (uno de los productos de la reacción de LCAT) son elevadas, LCAT puede catalizar la reacilación de la lisolecitina produciendo lecitina en presencia de LDL, presentando LCAT una actividad enzimática denominada lisolecitina aciltransferasa (LAT) (Subbaiah, 1986).

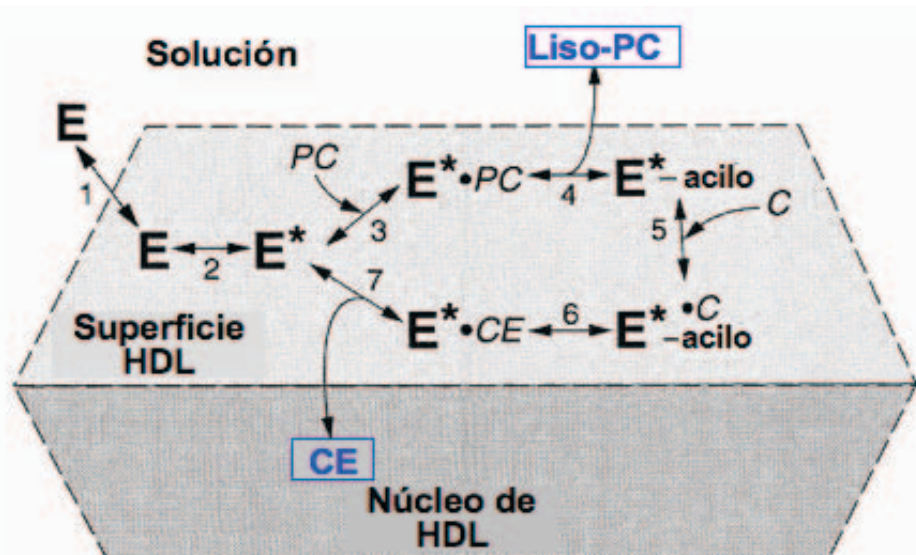


Fig. 1-3. Pasos involucrados en la reacción de LCAT sobre la superficie de HDL. E= LCAT en solución y sobre la superficie de HDL, E*= LCAT en forma activada por Apo A-I; PC= Fosfatidilcolina; C= Colesterol; CE= Éster de colesterol y Liso-PC= Lisofosfatidilcolina. Modificada de Jonas, 2000.

La reacción de transesterificación catalizada por LCAT se lleva a cabo de manera óptima a un pH de 8, empleando como sustratos tanto HDL como liposomas artificiales. En cuanto a su estabilidad, LCAT es considerada una enzima inestable, que incrementa dicha inestabilidad a medida que lo hace su grado de pureza (Albers *et al*, 1986). Su estabilidad es dependiente de la fuerza iónica del medio, siendo mayor en amortiguadores con muy baja fuerza iónica. Se ha sugerido que la inactivación de LCAT se presenta principalmente en la interfase “aire”-agua y que soluciones de alta fuerza iónica causan el desplegamiento completo de la enzima en la interfase. Dicha inactivación es eficientemente prevenida por la Apo AI y en menor grado por vesículas de fosfatidilcolina-colesterol y albúmina de suero bovino (BSA) (Doi y Nishida, 1981).

Finalmente, se ha reportado que la actividad de LCAT puede ser inhibida por una gran variedad de compuestos como son el di-isopropil fluorofosfato (DPF), el ácido di-tio-bis-nitrobenzoico (DTNB) y el *p*-hidroxi-mercuribenzoato (PHMB) (Albers *et al*, 1986). LCAT también es inhibida por lípidos siendo uno de sus más fuertes inhibidores la esfingomielina (Sparks *et al*, 1998). Otros inhibidores de origen lipídico son los hidroperóxidos de PC generados durante la oxidación incompleta de los lípidos de las lipoproteínas y moléculas de PC con ácidos grasos en posición *trans* o con cadenas de C-18. La inhibición por producto que experimenta LCAT, se observa cuando sus sustratos PC y colesterol que de manera general se unen eficientemente a LCAT en presencia de Apo AI, presentan una reactividad relativamente baja, en el caso en que los ésteres de colesterol productos de la reacción no puedan ser eficientemente eliminados del sitio activo (Kosek *et al*, 1999).

1.3. Estructura y propiedades de LCAT

La Lecitina Colesterol Aciltransferasa (LCAT) (EC 2.3.1.43) se sintetiza principalmente en el hígado y circula en el plasma unida reversiblemente con las lipoproteínas, de manera preferencial con las HDL. La LCAT de plasma humano consta de una sola cadena polipeptídica de 416 residuos aminoácidos

con un peso molecular (PM) de 47090 Da calculado a partir de la secuenciación de su DNAC (McLean *et al*, 1986). Con experimentos de sedimentación al equilibrio, dicho PM ha resultado ser de aproximadamente 60000 Da (Chong *et al*, 1983). Estudios de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), han mostrado que LCAT purificada a partir de plasma humano, tiene un PM de 65000 a 69000 Da con un valor promedio de 67000 Da, mientras que el tratamiento de LCAT nativa de plasma humano con varias endoglicosidasas muestra una banda correspondiente a un PM alrededor de 47000 Da (McLean *et al*, 1986).

La discrepancia entre los valores de PM encontrados por ambas técnicas, ha sido atribuida a su alto contenido de carbohidratos, el cual corresponde a aproximadamente el 25 % de su masa total (Chung *et al*, 1979). Esta glicoproteína presenta cuatro sitios de *N*-glicosilación (en Asn₂₀, Asn₈₄, Asn₂₇₂ y Asn₃₈₄) con una composición de 5.3 % de manosa, 6.4 % de galactosa, 5.3 % de glucosamina y 3 % de galactosamina (Lima *et al*, 1996) y dos sitios de *O*-glicosilación en T₄₀₇ y S₄₀₉ con estructuras sialidadas β -D-galactosil-(1 \rightarrow 3)-*N*-acetil-D-galactosamina (Schindler *et al*, 1995). El papel que juegan estos carbohidratos sobre la estructura y función de la enzima no ha sido esclarecido debido a la controversia de los resultados obtenidos. Estudios de mutagénesis sitio-dirigida han demostrado que la eliminación de carbohidratos en las posiciones 20, 84 o 272, resultan en una disminución de la actividad de la enzima, mientras que la proteína mutante deglicosilada en la posición 384, presenta un aumento del doble en dicha actividad (O *et al*, 1993). Múltiples propuestas han surgido acerca de la función biológica de los carbohidratos sobre LCAT: algunos autores han sugerido que los carbohidratos probablemente incrementan el tiempo de vida media de la enzima (de 4 días) reduciendo su susceptibilidad a enzimas proteolíticas, mientras que otros proponen que dichos oligosacáridos aprovisionan a la enzima de una interfase adecuada entre su esqueleto polipeptídico relativamente hidrofóbico y el ambiente hidrofílico del plasma (Lima *et al*, 2004). Con respecto a la microheterogeneidad resultante de la variación en sus cadenas de carbohidratos, se han encontrado al menos seis isoformas de LCAT con puntos

isoelectrónicos (pI) de 3.9 a 4.9, siendo la más abundante la que tiene un pI de 4.48 (Doi y Nishida, 1983; Holmquist y Bjellqvist, 1988).

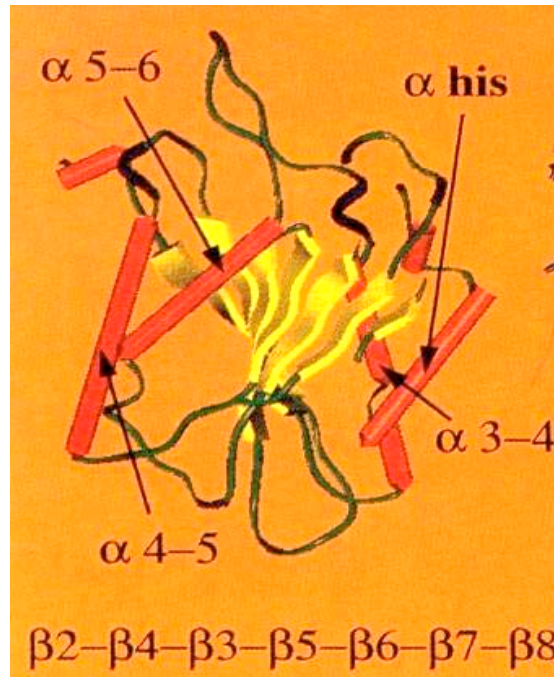
Además de las glicosilaciones, LCAT tiene seis residuos de cisteína en su secuencia de los cuales dos están libres (Cys₃₁ y Cys₁₈₄) y los otros cuatro se encuentran formando dos puentes disulfuro (Cys₅₀-Cys₇₄ y Cys₃₁₃-Cys₃₅₆), siendo el primero de ellos esencial para la unión de LCAT a la superficie de las lipoproteínas (Adimoolam y Jonas, 1997).

En general, la cadena polipeptídica de LCAT es más hidrofóbica que las Apos plasmáticas, pero más hidrofílica que una proteína integral de membrana (Jonas, 2000). El contenido de estructura secundaria de LCAT estimado por dicroísmo circular (DC), es de aproximadamente 25 % de hélice α , 45 % de estructuras β y 30 % de otras estructuras (Jonas, 1998). A diferencia de las Apos, en LCAT se han predicho pocas regiones con hélices α de tipo anfipático, una de las cuales corresponde al segmento en el cual se encuentra el puente disulfuro Cys₅₀-Cys₇₄.

Aunque aún no se ha podido determinar la estructura terciaria completa de LCAT, el grupo de Peelman *et al* (1998) ha reportado un modelo parcial de la estructura tridimensional de LCAT diseñado con base en cálculos de homología estructural obtenidos por diversos alineamientos de LCAT con la lipasa pancreática humana y la lipasa de *Candida Antarctica*. Dichos estudios han demostrado que LCAT pertenece a la familia de las lipasas, que tiene un plegamiento tipo α/β hidrolasa y que su triada catalítica incluye los residuos His₃₇₇, Asp₃₄₅ junto con Ser₁₈₁, aminoácido que se ha supuesto podría formar un intermediario Ser-acilo graso, enzima-acilo, formado después de la hidrólisis de la PC y previamente a la donación del ácido graso al esteroceptor de acilo (Jauhainen y Dolphin, 1990). Las predicciones sugieren que el dominio central de LCAT consiste en siete hojas β paralelas conservadas conectadas por cuatro hélices α y separadas por asas que contienen los residuos catalíticos. La Tabla 1-2 muestra un resumen de las propiedades de LCAT descritas en esta sección.

La Fig. 1-4 muestra tanto el modelo de la estructura tridimensional de LCAT reportado por Peelman *et al* (1998) como otro modelo obtenido en la base de datos Modbase (Pieper *et al*, 2004) correspondiente a los aminoácidos 62-436 de la secuencia completa de la proforma de LCAT (440 aminoácidos ; código P04180). En estos modelos puede observarse el dominio central de hojas β conectado por hélices α dentro de las cuales se destacan dos: la hélice 4-5 que se ha sugerido está involucrada en la unión a superficies lipídicas y en la especificidad de sustrato (fosfolípido) de la enzima, y la hélice 3-4 dentro de la cual, la región 121-136 ha sido identificada como un probable sitio de unión de LCAT a la hélice 6 de la Apo AI (Sorci-Thomas *et al*, 2009). En la Fig. 1-4b, se destacan también los residuos que forman parte de la tríada catalítica y tres de los sitios de *N*-glicosilación. Cabe destacar que de acuerdo con estos modelos, estos sitios característicos y determinantes en la actividad de LCAT forman parte de regiones no estructuradas de la enzima que podrían estar asociadas a cambios conformacionales de tipo desorden/orden, en los que la región catalítica queda expuesta al sustrato dependiendo de la unión de una región estructurada de la enzima a una superficie lipídica. Aún cuando el mecanismo por el cual este tipo de rearrreglos conformacionales no ha sido demostrado, modulaciones de este tipo han sido previamente propuestas en proteínas del tipo de LCAT con actividad en interfases. En el caso de la lipasa pancreática, por ejemplo, se ha propuesto que la cavidad del sitio activo se encuentra cubierta por un asa superficial que la protege del solvente cuando está en estado inactivo pero que es capaz de experimentar cambios conformacionales para exponerla a sus sustratos lipídicos (Jonas, 1991). De esta forma, es muy probable que el alto porcentaje de estructuras desordenadas presentes en la estructura de LCAT, tenga funciones reguladoras aún no caracterizadas dependientes de los cambios de hidrofobicidad a los que puede estar expuesta la enzima y que impacten en su funcionalidad.

a)



b)

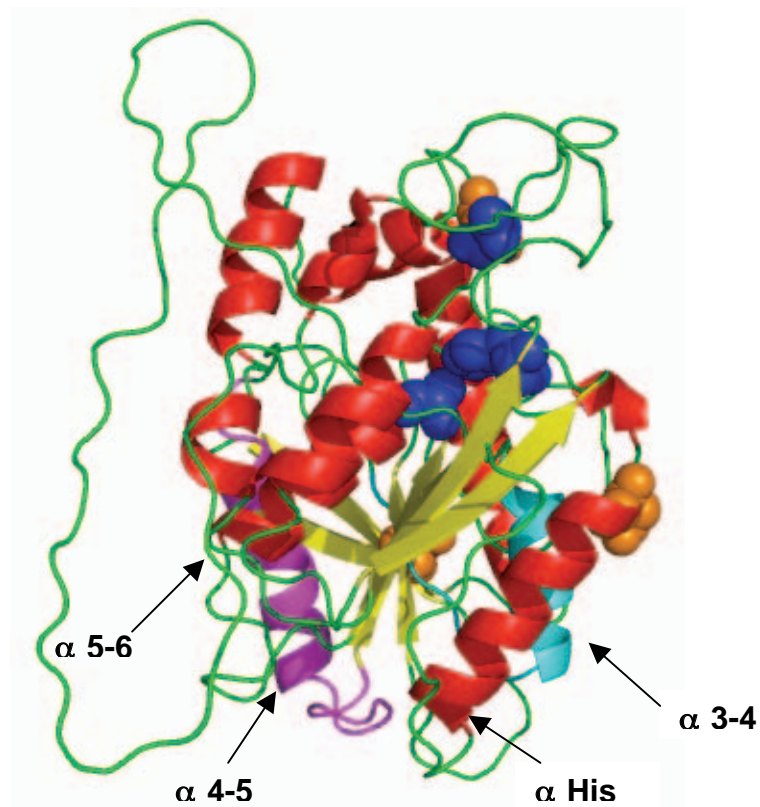


Fig. 1-4. Modelo propuesto para la estructura tridimensional de LCAT. a) Modelo derivado de las estructuras coordinadas de la lipasa pancreática y la lipasa de *Candida Antarctica* tomado de Peelman *et al*, 1998. b) Modelo de LCAT obtenido a partir del código P04180 con el programa Modbase (visualizado con Pymol) utilizando como templado la proteína 2,6-dihidroxi-pseudo-oxinicotina hidrolasa (PDB 2jbw). La conformación de LCAT muestra los residuos 62-436 de la secuencia de la proforma de LCAT (440 aminoácidos). Las hojas β se muestran en amarillo, las hélices α en rojo y las asas en verde. En color magenta se resalta la hélice 4-5 con propiedades de unión a lípido y en ciano la región de aminoácidos 121-136 de la hélice 3-4, que se ha sugerido interacciona directamente con la hélice 6 de la Apo AI. En azul se pueden identificar los aminoácidos que forman parte de la tríada catalítica S₁₈₁, D₃₄₅ y H₃₇₇ y en naranja los sitios de N-glicosilación N₈₄, N₂₇₂ y N₃₈₈.

Tabla 1-2. Resumen de las propiedades de la Lecitina Colesterol Aciltransferasa de plasma humano

Localización celular	<ul style="list-style-type: none"> • Sintetizada en hígado • Secretada al plasma
Cadenas polipeptídicas	1
Número de aminoácidos	416
Peso molecular (Da)	<ul style="list-style-type: none"> • 47090 (DNAc) • 60000 (Sedimentación al equilibrio) • 65000-69000 (SDS-PAGE)
Glicosilaciones	<ul style="list-style-type: none"> • 4 N-glicosilaciones • 2 O-glicosilaciones
Puentes disulfuro	2 puentes disulfuro + 2 cisteínas libres
Punto isoeléctrico	3.9- 4.9 (Mínimo 6 isoformas)
Contenido de estructura secundaria	<ul style="list-style-type: none"> • 25 % hélice α • 45 % de estructuras β • 30 % otras estructuras
Características de estructura terciaria	<ul style="list-style-type: none"> • No cristalizada • Modelo parcial basado en alineamientos con las lipasas pancreática y <i>Candida Antarctica</i> • Plegamiento tipo α/β hidrolasa • Dominio central con 7 hojas β paralelas conectadas por 4 hélices α, separadas por asas con los residuos catalíticos • Triada catalítica His₃₇₇, Asp₃₄₅ y Ser₁₈₁

1. 4. Propiedades estructurales de la Apolipoproteína AI

La Apo AI es secretada predominantemente por el hígado y el intestino como Apo AI pobre en lípido y como partículas de HDL nacientes ricas en fosfolípidos y pobres en colesterol. La Apo AI muestra una alta actividad superficial debido a sus propiedades anfipáticas. Es una proteína asimétrica y flexible con una tendencia a autoasociarse en dímeros, tetrámeros y octámeros (Scanu, 2008). Después de un proceso de lipidación parcial, la Apo AI puede formar partículas discoidales cuyos modelos indican que se componen de aproximadamente 150 moléculas de fosfolípido por cada 2 moléculas de Apo AI con un diámetro

hidratado final de disco de 96 Å (Klon *et al*, 2002). La formación de complejos esféricos puede ser obtenida reconstituyendo los complejos discoidales por co-sonicación de una mezcla de lípido-Apo AI, por diálisis con colato (Matz y Jonas, 1982) o por incubación con LCAT y LDL, dando como resultado partículas esféricas con un diámetro de 93 Å y 3 moléculas de Apo AI por partícula (Jonas *et al*, 1988) en un arreglo molecular de trébol (Silva *et al*, 2008). La Apo AI consiste en una sola cadena polipeptídica de 243 aminoácidos y PM de 28 kDa, que representa aproximadamente el 70 % en peso de la HDL (Lewis y Rader, 2005). El Apéndice 10.1. muestra el resumen de las propiedades estructurales de la Apo AI en los diferentes niveles de organización descritos.

La cadena polipeptídica de la Apo AI está dividida en un dominio amino-terminal globular de 43 residuos codificado por el exón 3 del gen de la Apo AI y un dominio carboxilo-terminal de unión a lípido de 200 residuos (44-243) codificado por el exón 4 que comprende aproximadamente el 80 % de la proteína (Fig. 1-5). Se ha considerado que los primeros 43 residuos de la región *N*-terminal se encuentran relativamente desordenados, presentando únicamente un arreglo de tipo hélice α anfipática G* en los residuos 8-33. Este tipo de hélices se distinguen por presentar un arreglo radial aleatorio de los residuos positivos y negativos que es similar pero no idéntico a las hélices clase G que se encuentran en las proteínas globulares. Presentan valores altos de momento hidrofóbico (μ H) y una hidrofobicidad moderadamente alta en la cara no polar (Segrest *et al*, 1992). La estructura secundaria del dominio carboxilo-terminal, se compone de una serie de 10 unidades de repetición en tándem de hélices α anfipáticas separadas por residuos de prolina. Ocho de esas repeticiones tienen 22 aminoácidos mientras que las repeticiones 3 y 9 tienen 11 (Klon, *et al*, 2002; Sorci-Thomas *et al*, 2009). De las 10 hélices α anfipáticas de este dominio de unión a lípido, seis pertenecen a la clase A y las otras cuatro a la clase Y. La clase A está caracterizada por tener altos valores de μ H promedio y una distribución de carga característica en la que los residuos cargados positivamente se encuentran agrupados en la interfase polar/no polar, mientras que los que están cargados negativamente se

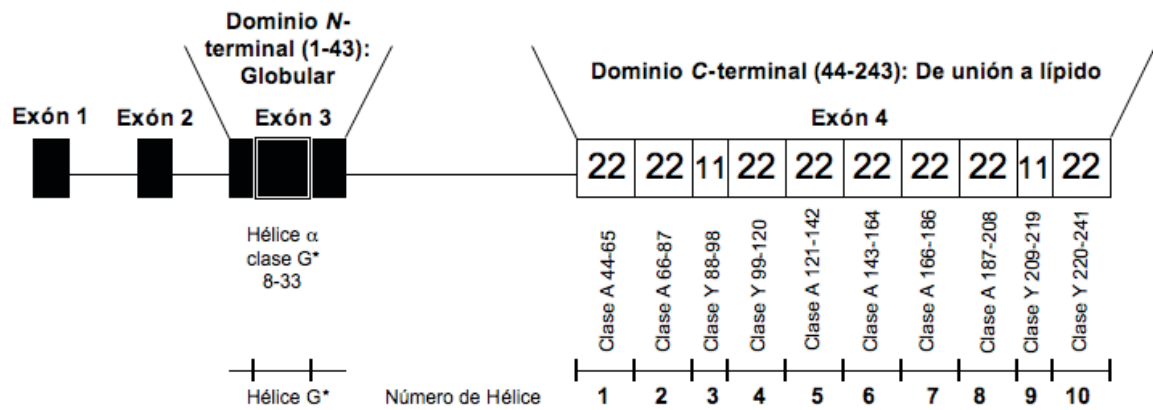


Fig. 1-5. Estructura del gen de Apo AI y dominios estructurales. La Apo AI presenta un dominio globular *N-terminal* codificado por el exón 3 y otro de unión a lípido codificado por el exón 4. El dominio globular presenta una hélice α clase G*. El dominio C-terminal presenta una serie de repeticiones en tándem de 10 hélices α de 22 y 11 aminoácidos pertenecientes a las clases A y Y tal como lo indica la figura.

encuentran en el centro de la cara polar. En cuanto a las hélices clase Y, éstas se caracterizan por presentar valores intermedios tanto de μH como de hidrofobicidad, comparados con los de otras clases de hélices con dominios anfipáticos (Segrest *et al*, 1992). Por lo general, este tipo de hélices presentan una reducida afinidad a lípido, sin embargo, se ha demostrado que la hélice Y de la Apo AI (220-241), es la que presenta una mayor afinidad por lípidos de entre todas sus hélices α (Palgunachari *et al*, 1996).

1.5. Activación de LCAT por la Apolipoproteína AI: Importancia de las transiciones desorden-orden

Además de la unión a la superficie del lípido, LCAT requiere de su activación por cofactores protéicos para obtener su actividad óptima. La Apo AI es reconocida como el principal activador de LCAT en la HDL discoidal naciente durante el TRC (Fielding *et al*, 1972). Asimismo, se ha demostrado que LCAT también puede ser activada por algunos péptidos sintéticos y otras Apos como la Apo E, Apo AIV y Apo CI, aunque en menor grado que la Apo AI (Jonas, 1991). Se ha propuesto que la activación de LCAT por Apos y péptidos requiere que éstos presenten estructuras de tipo hélice α con una cara no polar de menos de 180° , una región central de residuos ácidos opuesta a la cara no polar, una distribución de residuos básicos en la interfase polar-no polar y un

dominio de unión al lípido (Labeur *et al*, 1997). Dado que la Apo AI cumple con tales requerimientos, se ha sugerido que ejerce los siguientes efectos sobre la reacción de LCAT: media la unión de LCAT a superficies lipídicas, estabiliza la conformación de LCAT activada después de su unión al lípido, concentra los sustratos lipídicos en la vecindad de LCAT, une y presenta de manera específica a dichos lípidos en una conformación óptima para la enzima y finalmente, facilita la eliminación del producto y la disociación de LCAT de la superficie del lípido (Fig. 1-3). No obstante se le han asignado a la Apo AI dichas funciones, el mecanismo por el cual estas se llevan a cabo y la probable influencia de otras Apos en este proceso, aún no han sido del todo elucidados (Jonas, 1998). La falta de información acerca de estos mecanismos de activación, ha impulsado a nuestro laboratorio en la búsqueda de los mismos con un enfoque de relación estructura-actividad en el que segmentos derivados de la secuencia nativa de la Apo AI son analizados detalladamente tanto fisicoquímica como estructuralmente en ambientes con diferente hidrofobicidad que dan lugar a transiciones estructurales con probable función moduladora.

Con la finalidad de encontrar el mecanismo de activación de la Apo AI sobre LCAT, se han estudiado y asignado funciones específicas a cada región de la Apo AI que están estrechamente relacionadas con sus propiedades estructurales. La región del N-terminal de 8 a 33 residuos de la Apo AI (hélice G*), presenta un alto grado de estructura al azar en solución acuosa capaz de incrementar su helicidad en asociación con lípido (Brouillette *et al*, 2001). Estas características le han asignado una significativa capacidad de unión a lípido y una tendencia a formar estructuras de tipo amiloidogénicas (Zannis *et al*, 2006). En cuanto al dominio de unión a lípido, se ha sugerido que las hélices 1 y 10 terminales de esta región, están directamente involucradas en la asociación con lípido y que probablemente se encargan de anclar a la LCAT a la superficie de la lipoproteína. A diferencia de las regiones N y C-terminales de la Apo AI, la región central no posee propiedades importantes de unión a lípido y se ha propuesto que está involucrada en la activación de LCAT. Investigaciones recientes han mostrado con base en el modelo de doble cinturón de la Apo AI asociada a HDL, que los residuos 159 a 180 de cada cadena de Apo AI, sobresalen del cuerpo de la partícula como asas expuestas

al solvente, y que cada uno de estas asas que incluye un residuo de Tyr₁₆₆, funciona como un sitio de interacción con LCAT y es crucial para su activación (Wu *et al*, 2007). Con lo que respecta a la región de interacción de LCAT con la Apo AI, la Fig. 1-6 muestra un modelo hipotético de interacción de LCAT con una HDL recombinante, en el que se destaca la importancia de la región 121-136 de LCAT identificada como un probable sitio de unión de LCAT a la hélice 6 de la Apo AI (Sorci-Thomas *et al*, 2009). Este modelo muestra que después de hacer el acoplamiento de LCAT con la Apo AI de la HDL (Fig. 1-6b), tanto la hélice 6 de la Apo AI (143-164) como la región 121-136 de LCAT, dejan de estar expuestas debido a la interacción entre ambas regiones.

Este solo fue un ejemplo del tipo de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido que se han propuesto para el modelo de interacción de LCAT con la Apo AI como parte de la HDL, sin embargo, aún falta por esclarecer el tipo de cambios estructurales de tipo desorden-orden a los que se ven sometidas las regiones involucradas en dichas interacciones. Aún cuando esta clase de modelos permiten plantear hipótesis probables para identificar las regiones de interacción involucradas en este sistema y pudieran explicar el tipo de estructura que presentan ambas proteínas en esa fase del proceso, muchas incógnitas referentes al tipo de cambios estructurales que sufre este complejo lipoproteína-enzima durante la fase de remodelamiento y maduración de la HDL, quedarían todavía sin resolver.

Para poder esclarecer los mecanismos que gobiernan la función activadora de la Apo AI, en los últimos años nuestro grupo de trabajo ha emprendido dicha investigación llevando a cabo mediciones directas de los cambios conformacionales moleculares de diversas Apos intercambiables colocadas en forma de monocapas en la interfase aire/agua formando lo que se conoce como una monocapa de Langmuir. Para el caso de la Apo CI, los resultados de dichas investigaciones mostraron que cuando es colocada en dicha interfase aire/agua o lípido/agua, esta Apo tiende a confinarse extendida hacia dicha interfase y que como respuesta a un aumento de presión lateral, un segmento terminal de tipo hélice α de la proteína se dirige hacia la fase hidrofóbica del sistema penetrando la monocapa de lípido (Bolaños-García *et al*, 1999;

Bolaños-García *et al*, 2001). Extrapolando estos cambios conformacionales a los que suceden sobre la superficie de una lipoproteína, se ha sugerido que la presión lateral en la monocapa de fosfolípidos de la HDL naciente embebida con diferentes Apos y proteínas accesorias, podría llegar a ser relativamente alta, disminuyendo conforme el tamaño y forma de esta partícula aumentan debido a la acumulación de ésteres de colesterol en su núcleo. Este fenómeno podría definir la conformación de las Apos y por tanto su función específica (Xicohtencatl-Cortes *et al*, 2004).

Una vez demostrada la tendencia de las Apos de permanecer en la interfase lípido/agua y los cambios conformacionales que éstas sufren por acción de una presión externa, nuestro grupo procedió a evaluar si el tipo de estructura secundaria de dichos segmentos móviles cambiaba en función de su ambiente externo. Los resultados obtenidos con el segmento C-terminal de la Apo CI, demostraron que este péptido en solución no se encuentra estructurado y que, en presencia de moléculas lipídicas de tipo anfipático, es capaz de estructurarse en forma de hélice α . Así, es probable que este segmento sea susceptible de sufrir una transición desorden-orden promovida por su desplazamiento a una interfase hidrofóbica/hidrofílica dependiendo de la compactabilidad y tamaño de las HDL (Mendoza-Espinosa *et al*, 2008).

Una vez demostrado para segmentos de la Apo CI que estos cambios conformacionales son dependientes del medio que “sensen”, podría suponerse que un fenómeno similar ocurre con segmentos derivados de Apo AI y, más aún, que estos cambios son cruciales para la modulación de la actividad de LCAT así como de la función del resto de las Apos que forman parte de todo ese complejo macromolecular denominado HDL.

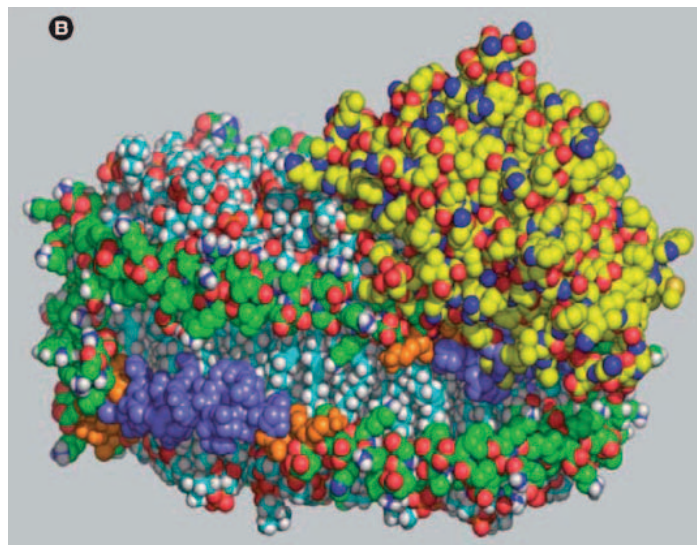
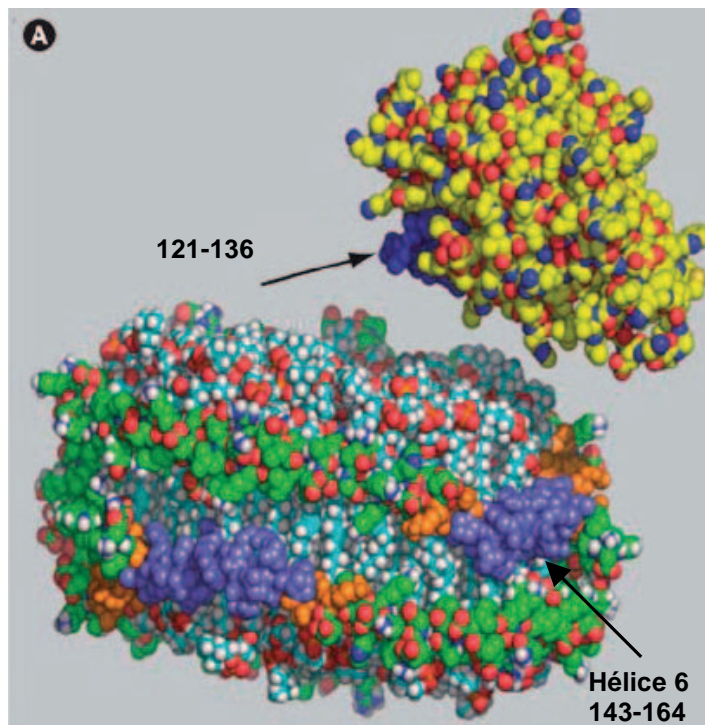


Fig. 1-6. Modelo hipotético de la interacción de la Lecitina Colesterol Aciltransferasa con una HDL recombinante compuesta de 150 moléculas de palmitoiloleoil fosfatidilcolina (POPC) con 2 moléculas de Apo AI. a) Antes del acomplamiento. b) Después del acomplamiento con la hélice 6 de la Apo AI. En verde se muestran las dos moléculas antiparalelas de Apo AI que rodean a la partícula de HDL resaltándose en púrpura los residuos correspondientes a la hélice 6 y en naranja los residuos 140-178 que se ha reportado participan en la activación de LCAT (en amarillo). La región 121-136 de LCAT está resaltada en azul. La conformación de LCAT muestra los residuos 9-420 de la proforma de LCAT. El modelo fue obtenido de Modbase y visualizado con Pymol. Figura tomada de Sorci-Thomas *et al*, 2009.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que uno de los aspectos más importantes para evaluar la activación de LCAT es el tipo de interacciones que ésta presenta tanto con superficies lipídicas como protéicas sobre la superficie de la HDL, fue necesario realizar un estudio de tipo estructura-actividad que permitiera elucidar el papel que juegan tanto regiones específicas de la Apo AI (su principal activador), como los lípidos que conforman a las partículas sobre las cuales actúa.

Para analizar la función de la Apo AI sobre la activación de LCAT, se diseñaron péptidos derivados de esta Apo que fueran representativos de ciertas regiones funcionales de este cofactor (*N*-terminal, inicial central y *C*-terminal) y que presentaran las propiedades anfipáticas necesarias para activar LCAT. Una vez diseñados, se procedió a determinar si estos segmentos eran capaces de sufrir transiciones de tipo orden/desorden y/o desorden-orden en función de los cambios de hidrofobicidad de su medio de reconstitución. Como primera aproximación en este estudio de estructura-actividad, se evaluó el efecto de estos péptidos sobre la actividad de LCAT en plasma, ya que este es el medio natural en el que actúan tanto LCAT como todos los elementos involucrados en el transporte del colesterol.

El presente trabajo tiene la finalidad de determinar la importancia de la estructura secundaria de los segmentos en estudio y el tipo de transiciones desorden-orden que estos sufren en función del ambiente externo que “sensan”. La extrapolación de los cambios analizados a nivel molecular hacia niveles más altos de organización como son las lipoproteínas, nos permitirán reconocer la importancia de los factores moduladores de los mecanismos que gobiernan determinado proceso fisiológico así como sus alteraciones. Un entendimiento apropiado de estos conceptos podría permitir incluso, el diseño y síntesis de pequeñas moléculas simples con propiedades antiaterogénicas.

III. HIPÓTESIS

La actividad enzimática de LCAT estará modulada por la presencia de péptidos derivados de la apolipoproteína AI de plasma humano. Estos péptidos tendrán un efecto diferenciado de acuerdo con la estructura secundaria que presenten en función de las características fisicoquímicas (por ejemplo anfipaticidad) del ambiente externo en el que se encuentran. Las consecuentes transiciones orden/desorden y/o desorden-orden, podrán considerarse interruptores (switches) moleculares de la actividad de LCAT.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de péptidos derivados de la Apolipoproteína AI humana sobre la actividad de LCAT y proponer un posible mecanismo regulador de la actividad de esta enzima, con base en los cambios de estructura secundaria de dichos segmentos expuestos a cambios en las características de hidrofobicidad del medio que las rodea.

Objetivos particulares

- Determinar el tipo de estructura que presentan péptidos derivados de la Apo AI, tanto en un ambiente acuoso como en uno lipídico y definir si existen transiciones de tipo desorden-orden dependientes del medio externo.
- Realizar ensayos de actividad de LCAT en plasma en presencia de los péptidos derivados de la Apo AI en diferentes conformaciones y correlacionar dichos cambios conformacionales con su efecto biológico.
- Definir y optimizar el protocolo de purificación de la enzima LCAT a partir de plasma humano.
- Realizar ensayos de actividad con fracciones enriquecidas o purificadas de LCAT en presencia de los péptidos derivados de la Apo AI en diferentes conformaciones, en un sistema con composición y concentración finamente controlado.

V. Materiales y métodos

5.1. Síntesis de los péptidos derivados de Apo AI y análisis de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales

Se sintetizaron tres péptidos (GenScript Corporation, NJ, USA, pureza > 98%) diseñados con base en la secuencia reportada de la Apo AI (Brewer *et al*, 1978) y seleccionados en función de sus propiedades fisicoquímicas como carga, momento hidrofóbico, capacidad de formar hélices alfa y una putativa función en la Apo AI asociada a la HDL. Los péptidos se nombraron de acuerdo a las primeras letras de sus aminoácidos: el péptido **DRV**, correspondiente a la región amino terminal de la Apo AI (residuos 9 a 24), el péptido **KLL** proveniente de una región intermedia (residuos 45 a 63) y finalmente el péptido **VLES** procedente de la región carboxilo terminal de la Apo AI (residuos 221 a 239). En la Fig. 5-1 se muestra la estructura completa de la Apo AI en la que se pueden apreciar las regiones donde se localizan los péptidos. Para las representaciones de rueda helicoidal (helical wheel) y cálculo de momento hidrofóbico (μH) de cada uno de los péptidos, se utilizó el programa PROTEAN de DNASTAR. El cálculo de μH se basó en la ecuación 1, cuyos valores de H_n corresponden a los reportados por Eisenberg *et al*, 1989.

$$\mu H = \frac{1}{N} \sqrt{\left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(\partial n) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(\partial n) \right]^2} \dots (1)$$

Donde:

μH = valor de momento hidrofóbico

N = número total de aminoácidos del segmento peptídico

H_n = hidrofobicidad del enésimo residuo

∂ = 100 grados de arco en radianes (ángulo entre las cadenas laterales de cada aminoácido en una hélice α teórica perfecta).

n = enésimo residuo

Los cálculos teóricos del peso molecular (PM), punto isoelectrico (pI) y coeficiente de extinción molar (ϵ), se hicieron con el programa Biology WorkBench 3.2.

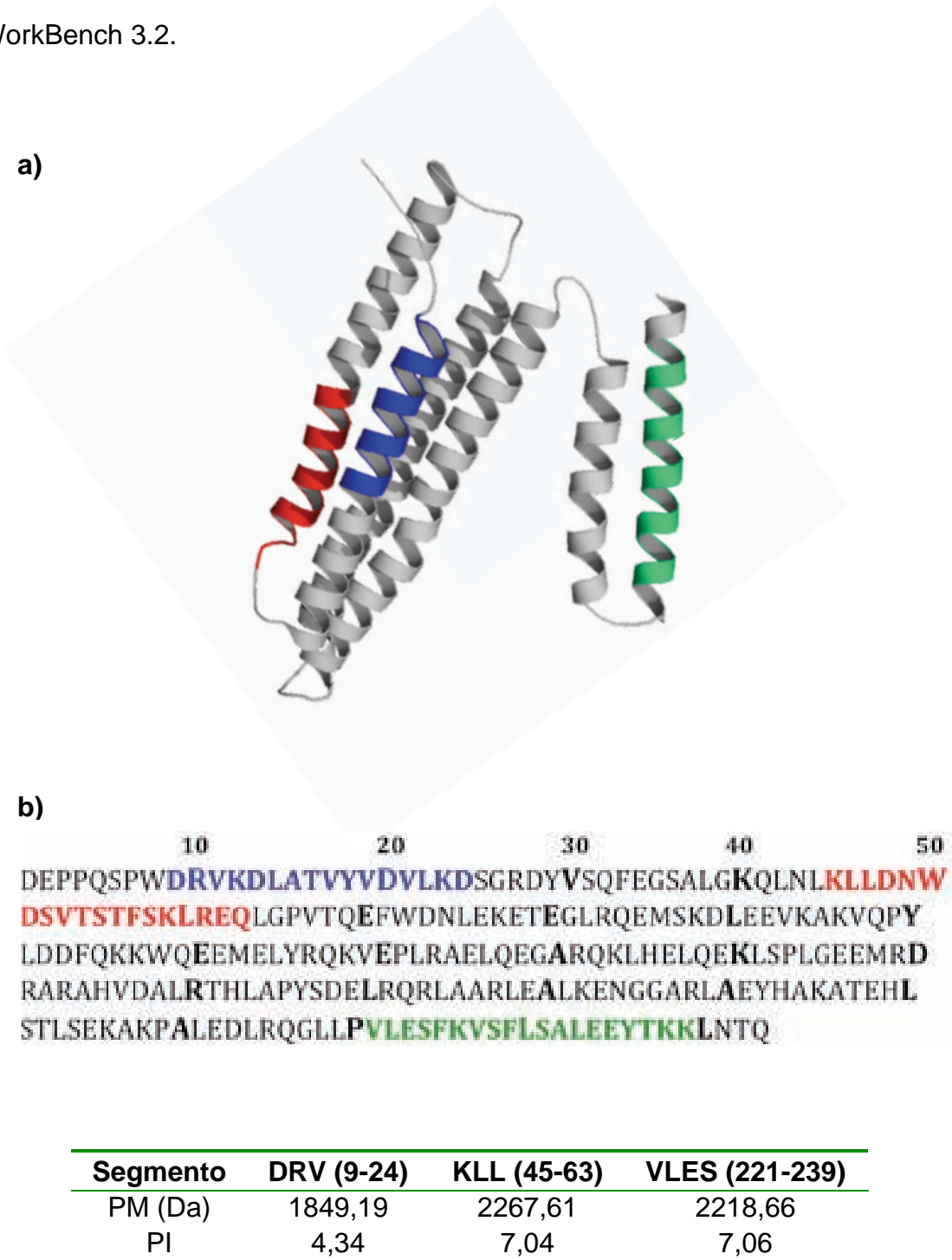


Fig. 5-1. Estructura de la Apolipoproteína AI y localización de los péptidos en estudio.
a) Estructura cristalina de Apo AI monomérica en la que se muestran las regiones correspondientes a los péptidos DRV, KLL y VLES (PDB ID code 2A01). b) Secuencia de aminoácidos de Apo AI (arriba) y algunas propiedades de los péptidos ya mencionados (abajo). Código de colores: DRV=azul, KLL=rojo y VLES=verde.

5.2. Reconstitución de los péptidos DRV, KLL y VLES

Con la finalidad de llevar a cabo ensayos que permitieran comparar el efecto de la estructura secundaria de los péptidos sobre la actividad de LCAT, éstos se reconstituyeron en dos medios diferentes: uno acuoso que consistió en amortiguador PBS pH 7.4 y otro lipídico en el que se utilizó el lisofosfolípido 1-Lauril-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (Liso-C₁₂PC, Avanti Polar Lipids, disuelto en cloroformo) para estructurar los péptidos en conformación α . El agua que se utilizó para todas las preparaciones y diluciones (tanto acuosas como lipídicas), se ultrapurificó en un sistema MilliQ con filtro de 0.22 μm (Millipore) y se degasificó con flujo de N₂.

5.2.1. Ensayos con los péptidos reconstituidos en un medio hidrofílico

Para hacer las determinaciones de dicroísmo circular (DC), los péptidos liofilizados se pesaron y reconstituyeron adicionando el volumen necesario de amortiguador PBS pH 7.4 para tener una concentración final de 0.3 y 0.6 mg/mL. La mezcla se agitó con vórtex hasta disolver completamente los péptidos. Dado que DRV y VLES presentan una alta hidrofobicidad, no fue posible reconstituirlos por completo a 0.9 mg/mL.

Para hacer un análisis cinético con ensayos de actividad y determinar el tiempo de incubación al cual se alcanzaba la máxima producción de ésteres de colesterol en medio acuoso, se utilizó como fuente de enzima plasma en presencia de los péptidos a concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/mL (ver sección 5.4). Estas preparaciones con péptido se hicieron partiendo de soluciones concentradas de 1 y 2 mg/mL, respectivamente.

5.2.2. Ensayos con los péptidos reconstituidos en un medio lipídico

Ensayos de DC y de actividad con péptidos a 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL en Liso-C₁₂PC 30, 60 y 90 mM, respectivamente.

Los péptidos liofilizados se disolvieron directamente en una emulsión de Liso-C₁₂PC, en una relación 1:200 (mol: mol), péptido: lípido, en la que se tuvo aproximadamente una molécula de péptido por cada 200 de Liso-C₁₂PC, dependiendo del peso molecular del péptido. Para hacer las determinaciones de DC, se preparó un stock de péptido a 0.9 mg/mL disuelto en Liso-C₁₂PC 90 mM a partir del cual se hicieron diluciones 1:1.5 y 1:3 para llegar a las concentraciones de péptido de 0.6 y 0.3 mg/mL en Liso-C₁₂PC 60 y 30 mM, respectivamente.

Para la preparación del Liso-C₁₂PC, se calculó el volumen de Liso-C₁₂PC/cloroformo necesario para obtener el stock con una concentración de 90 mM y se introdujo con una jeringa Hamilton en un tubo de microcentrífuga con la tapa previamente horadada. El lípido se dejó secar en un sistema concentrador Speed-Vac, por aproximadamente 24 h y en oscuridad hasta eliminar completamente el cloroformo. Una vez seco el lípido se reconstituyó en agua con agitación vigorosa y entonces se usó como diluyente para el stock de péptido (0.9 mg/mL), a partir de la cual se hicieron las diluciones antes dichas. Las preparaciones se dejaron reposar protegidas de la luz, por 24 h a 25 °C, antes de ser analizadas por DC.

Para hacer los ensayos de actividad se partió de una preparación stock de 3 mg/mL de péptido en Liso-C₁₂PC 300 mM a partir de la cual se hicieron diluciones 1:1.5 y 1:3 con agua MilliQ para tener finalmente concentraciones de péptido de 2 y 1 mg/mL en Liso-C₁₂PC 200 y 100 mM. De esas preparaciones, se tomaron alícuotas de 3 µL y se llevaron a 10 µL con plasma, dando finalmente concentraciones de péptido de 0.9, 0.6 y 0.3 mg/mL en Liso-C₁₂PC 90, 60 y 30 mM en la fuente de enzima de acuerdo al protocolo descrito en la sección 5.4.

Ensayos de DC y de actividad con péptidos a 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL en Liso-C₁₂PC 30 mM.

Los péptidos y el lípido se prepararon tal como se describió anteriormente pero a una concentración fija de lisofosfolípido de 30 mM. Para los ensayos de DC, se partió de una preparación stock de 0.9 mg de péptido/ mL en Liso-C₁₂PC 30 mM, a partir de la cual se hicieron diluciones 1:1.5, 1:3 y 1:9 con Liso-C₁₂PC 30 mM, para tener concentraciones finales de péptido de 0.6, 0.3 y 0.1 mg/mL en Liso-C₁₂PC 30 mM. Todas estas preparaciones se dejaron reposar por 24 h, en oscuridad y a 25 °C, antes de ser analizadas por DC. Para los ensayos de actividad se partió de un stock con concentración de péptido de 3 mg/mL en Liso-C₁₂PC 100 mM, a partir de la cual se hicieron diluciones 1:1.5, 1:3 y 1:9 con Liso-C₁₂PC 100 mM para tener concentraciones finales de péptido de 2, 1 y 0.3 mg/mL en Liso-C₁₂PC 100 mM. Alícuotas de 3 µL de estas preparaciones se llevaron a 10 µL con plasma de acuerdo con el método de preparación de fuente de enzima (sección 5.4) para tener las concentraciones finales de péptido de 0.9, 0.6, 0.3 y 0.1 mg/mL en Liso-C₁₂PC 30 mM.

5.3. Estimación del contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI por Dicroísmo Circular (DC)

La estructura secundaria de los péptidos DRV, KLL y VLES, se determinó por espectroscopía de DC en la región espectral de UV lejano que va de 190 a 260 nm, región en la cual el cromóforo corresponde al enlace peptídico de la macromolécula. Basada en las propiedades quirales de los aminoácidos y de su interacción con luz circularmente polarizada, la técnica permite obtener espectros de DC característicos para los diferentes tipos de estructura secundaria: un espectro en forma de “W” con mínimos alrededor de 208 y 222 nm, indican la presencia de estructuras α -helicoidales, mientras que un espectro en forma de “V” con un mínimo alrededor de 217-220 nm, es indicativo de la presencia de hojas β (Ranjbar y Gill, 2009) (Fig. 5-2).

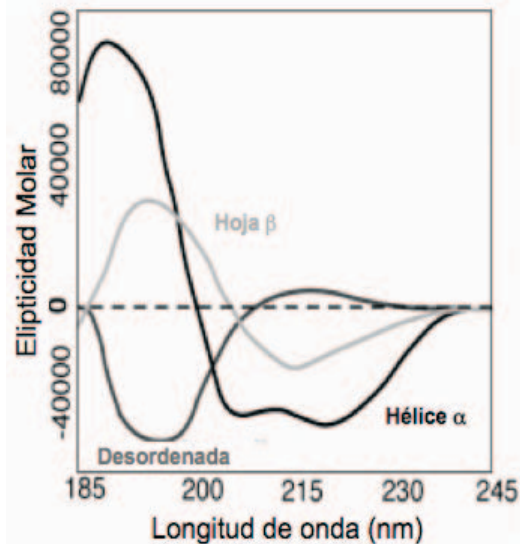


Fig. 5-2. Espectros característicos de Dicroísmo Circular en la región del UV-lejano de una proteína desordenada y de proteínas con un contenido prevalente de hélice α o de hojas β . Figura modificada de Receveur-Bréchet, *et al*, 2006.

Los espectros de DC de los péptidos en solución, se obtuvieron con un espectropolarímetro Aviv 62DS, utilizando celdas de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico, haciendo barridos en la región del UV lejano (190 a 260 nm), con un tiempo de integración de 2.5 seg cada 1 nm a 25 o 37 °C dependiendo del ensayo. La respuesta del instrumento se reportó como elipticidad molar promedio por residuo (θ), en unidades de grado por centímetro cuadrado por decimol ($\text{grado}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$). Para el manejo de datos se empleó el software Aviv CD V 2.94, que basa su cálculo de conversión a elipticidad molar promedio θ , en la ecuación 2.

$$[\theta] = \frac{\text{Miligrados}_{\text{experimentales}}}{\text{Número de } x \text{ [péptido]} \times \text{Longitud} \times 10} \quad \dots (2)$$

aminoácidos de la celda

Donde:

$[\theta]$ = Elipticidad molar promedio por residuo

$[\text{péptido}]$ = Concentración Molar del péptido

y la longitud de la celda está dada en cm

Para calcular el porcentaje de las diferentes clases de estructura secundaria presente en las muestras de los péptidos y detectadas en los espectros de DC, se utilizó el software CDNN, el cual usa el método de deconvolución basado en redes neuronales que aplican el algoritmo de propagación inversa (Dalmas *et al.*, 1994). Con fines comparativos, el contenido de estructura secundaria también se estimó utilizando el paquete de programas CDPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>) con el cual es posible analizar la estructura secundaria de los péptidos con SELCON3, CDSSTR y CONTIN/LL partiendo de un solo archivo INPUT generado con el programa CRDATA que también está incluido en el paquete. SELCON3 es un método de auto-consistencia (Sreerama y Woody, 1993) en el que el espectro de la proteína analizada se incluye en la matriz de los datos del espectro de DC y se hace una primera predicción de la estructura de DC de ésta a partir de la estructura de la proteína de referencia que tenga el espectro más similar al de la proteína analizada. La solución reemplaza la predicción inicial y el proceso es iterado por convergencia. CDSSTR utiliza solo un número mínimo de proteínas de referencia que son seleccionadas aleatoriamente. A partir de estas proteínas se construye un largo número de combinaciones a partir de las cuales se obtienen soluciones utilizando un algoritmo de formulación auto-consistente que usa la descomposición del valor singular (SVDA) para asignar la estructura secundaria de la proteína (Johnson, 1999). Finalmente, CONTIN/LL usa el procedimiento de regresión de crestas que ajusta el espectro de DC de la proteína de prueba como una combinación lineal del espectro de DC de un número N de proteínas de referencia (Provencher y Glöckner, 1981). El uso del paquete de CDPro permitió comparar y confirmar con un alto grado de certeza los resultados obtenidos con CDNN, ya que los tres programas incluidos en el paquete han sido modificados y adaptados para evitar las incongruencias que generalmente se presentan entre los diversos programas de análisis de DC debido a las diferencias en sus algoritmos y proteínas de referencia (Sreerama y Woody, 2000). Estos programas nos proporcionaron además los valores de RMSD y NRMSD obtenidos de cada programa, como medida de las diferencias entre los valores de predicción del modelo y los valores experimentales del espectro de DC.

5.4. Determinación de la actividad de LCAT en plasma humano

La actividad de LCAT se determinó con una modificación del método reportado por Glomset y Wright (1964) y Glomset (1969), en el que se utilizó como sustrato plasma humano inactivado por calor marcado con [³H] colesterol que fue incubado con una alícuota de la enzima a 37 °C. La reacción se detuvo a intervalos de tiempo apropiados y se extrajeron los lípidos del plasma para posteriormente determinar la cantidad formada de éster de [³H] colesterol. El sistema completo de ensayo fue el siguiente: *emulsión [³H] Colesterol/ albúmina - plasma inactivado - fuente de enzima (1:8:1 v/v)*.

De acuerdo con este sistema, cada tubo de reacción se preparó con 90 µL de sustrato (que incluyeron 10 µL de emulsión marcada y 80 µL de plasma inactivado) y 10 µL de fuente de enzima (plasma o fracción enriquecida, con o sin péptidos), dando un volumen final de 100 µL de mezcla de reacción.

Para preparar el sustrato, plasma humano de aproximadamente 3 semanas de almacenamiento a -70 °C, se inactivó con calentamiento a 60 °C por 30 min. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 13200 rpm por 3 min en una microcentrífuga Eppendorf 5415R, para eliminar el precipitado formado. Por otro lado, la emulsión [³H] colesterol/ albúmina, se preparó inyectando una alícuota de [³H] colesterol (actividad específica 20 Ci/mmol, disuelto en etanol, ART.0257 American Radiolabeled Chemicals,) equivalente a 1 nmol de [³H] colesterol (0.08 µCi) por µL de preparación, bajo la superficie de una solución de albúmina sérica bovina libre de grasas al 5 % (BSA, Fracción V, SIGMA) en cloruro de sodio 0.15 M, cuyo volumen fue el correspondiente al de la emulsión total. Una vez hecha esta mezcla, se dejó reposar por 20 min a temperatura ambiente y a continuación se eliminó el etanol de la mezcla por evaporación con flujo de N₂. Una parte de esta emulsión estable fue mezclada por cada ocho de plasma inactivado. La mezcla se incubó de 2-4 h a 37 °C para permitir se equilibrara la emulsión de [³H] colesterol con las lipoproteínas del plasma precalentado. Terminada la incubación, el sustrato se utilizó para el ensayo de actividad.

La reacción se inició al adicionar 10 μ L de fuente de enzima por cada 90 μ L de sustrato. El plasma que se utilizó como fuente de enzima, se descongeló y centrifugó a 13200 rpm por 3 min a 4 °C para eliminar agregados de proteína. De los 10 μ L de fuente de enzima, 7 μ L correspondieron a plasma (como fuente de LCAT) y los 3 μ L restantes a amortiguador PBS pH 7.4 o a preparación de péptido según el ensayo. Para el monitoreo de la purificación, como fuente de enzima se adicionaron 10 μ L de cada una de las fracciones enriquecidas con la misma cantidad de proteína en cada alícuota. La mezcla de reacción completa (1:8:1 del sistema completo de ensayo) se incubó a 37 °C a diferentes intervalos de tiempo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo agregando 800 μ L de digitonina (alta pureza, Calbiochem) al 1 % en etanol al 95 %, de acuerdo con Piran y Morin (1979). Esta mezcla se agitó con vórtex durante 15 seg. Posteriormente, se adicionó como acarreador un volumen de 40 μ L de colesterol frío (SIGMA) a una concentración de 5 mg/mL en etanol y se agitó nuevamente esta mezcla con vórtex durante 15 seg. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 10 min (Microfuge 11, Beckman) para sedimentar las proteínas y el colesterol tratado con digitonina. Del sobrenadante obtenido, se tomó una alícuota de 800 μ L a la que se agregaron 3 mL de líquido de centelleo (Universol ES) para determinar por radioactividad la cantidad de ésteres de colesterol marcados en un espectrómetro de centelleo líquido.

El control para obtener la radioactividad de fondo del sobrenadante se preparó sustituyendo la fuente de enzima por amortiguador en la mezcla de incubación, mientras que para determinar el número de cuentas totales se sustituyeron tanto la digitonina como el colesterol por etanol al 95 %, durante la fase de extracción de lípidos.

Para la determinación de la actividad de LCAT en plasma humano en presencia de péptidos derivados de Apo AI, los péptidos se reconstituyeron tal como se indica en la sección 5.2, considerando las preparaciones stock y diluciones ahí descritas para tener las concentraciones requeridas de péptido /lípidos en la preparación final de fuente de enzima, considerando la última dilución 3:10, en la que 3 μ L correspondían a la fuente de péptido y 7 μ L al

plasma como fuente de LCAT de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. La preparación de fuente de enzima en presencia de péptido se dejó reposar por 1 h a 25 °C antes de introducirse al tubo de reacción con el sustrato.

Análisis de los datos de actividad de LCAT

El comportamiento cinético de la reacción de LCAT, se analizó mediante la determinación de la velocidad de la reacción graficando la aparición de productos (ésteres de ³H-Colesterol) en función del tiempo para obtener la respectiva curva del avance o saturación de la reacción que representa la cinética de la reacción de LCAT. A partir de estas curvas, dos parámetros fueron calculados para evaluar el efecto de los péptidos de Apo AI sobre la actividad de LCAT:

a) La **velocidad inicial de la reacción (V_o)** se determinó calculando el valor de la pendiente de la región lineal de la curva del avance de la reacción correspondiente al intervalo de 0 a 1 horas de reacción mediante la ecuación (3):

$$m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1} \quad \dots (3)$$

Donde:

m= pendiente de la región lineal de la curva del avance de reacción de LCAT correspondiente al intervalo de 0 a 1 horas de reacción.

$Y_2 - Y_1$ = Cambio en la cantidad de producto formado por acción de LCAT desde un tiempo de 0 h (Y_1) a uno de 1 h (Y_2).

$X_2 - X_1$ = Cambio del intervalo de tiempo de X_1 (0 h) al X_2 (1 h).

b) La **formación máxima de producto** se calculó con la finalidad de conocer la cantidad máxima de ésteres de ^3H -Colesterol que pueden ser producidos en la reacción catalizada por LCAT bajo las condiciones de ensayo descritas, independientemente de las variables que pueden afectar la reacción en tiempos largos de incubación tales como inhibición por producto, inactivación de la enzima, etc.

Este parámetro se determinó calculando los picomoles (μmol) de producto formados en 5 h de incubación de la enzima con su sustrato bajo las condiciones de ensayo previamente descritas y se reportó en unidades de **$\mu\text{mol/h}$** . Las 5 h se definieron a partir de la región asintótica de la curva de la cinética de reacción de LCAT y la consideramos como una medida de la cantidad máxima de ésteres de colesterol que pueden formarse por acción de LCAT en condiciones saturantes.

Una vez definido el tiempo al cual se obtiene la cantidad máxima de producto por acción de LCAT, se utilizó este parámetro para hacer el cálculo de las actividades específicas:

c) **En los ensayos con plasma**, se dividieron los μmol formados por cada 5 h de incubación, entre el volumen de plasma utilizado como fuente de enzima. Esta actividad específica se reportó en unidades de **$\mu\text{mol de ésteres de } ^3\text{H-Colesterol/ mL plasma/h}$** .

d) **En los ensayos con fracciones enriquecidas** que se obtuvieron durante el proceso de purificación de LCAT, los datos se reportaron en **$\mu\text{mol de ésteres de } ^3\text{H-Colesterol/ mg proteína/h}$** . En este caso se calculó la cantidad de proteína total en cada una de las fracciones obtenidas tal como se describe en la sección 5.6.

5.5. Purificación de LCAT: Método final.

Plasma humano de aproximadamente 3 semanas de almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, fue donado por la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, D. F., México. Todos los pasos del proceso se llevaron a cabo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a menos que otra cosa se especifique y todos los amortiguadores se filtraron por $0.22\text{ }\mu\text{m}$ y se prepararon con agua ultrapurificada en un sistema MilliQ con filtro de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) y degasificada con flujo de N_2 . Cada una de las fracciones obtenidas en todo el procedimiento se sometieron a ensayos de actividad (sección 5.4) y de identificación (sección 5.6).

Para eliminar cualquier sedimento, se descongeló 1 L de plasma y se centrifugó a 8000 g por 20 min. El sobrenadante resultante, se fraccionó adicionándole 0.5 L de una solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0 y manteniendo en agitación la mezcla durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Varma y Soloff, 1976). La suspensión se centrifugó a 5000 g por 60 min en una centrifuga Avanti J-26XP Beckman Coulter. El sobrenadante se obtuvo por decantación, se filtró con un sistema de vacío Millipore utilizando membranas de PVDF con tamaño de poro de $0.45\text{ }\mu\text{m}$, se concentró por ultrafiltración con un sistema Amicon utilizando membranas con un corte molecular de 30 kDa y se dializó contra amortiguador Tris 10 mM, pH 7.4. Después de determinar la concentración y actividad enzimática tanto de la pastilla como del sobrenadante, este último se sometió a una cromatografía por intercambio aniónico en un sistema de separación de cromatografía líquida tipo FPLC (Pharmacia) con un sistema de detección de UV a 280 nm. Se usaron cinco columnas armadas en tándem pre-empacadas con 5 mL de Q Sepharose XL cada una (Amersham Biosciences), que se equilibraron con Tris 20 mM pH 7.4. Se inyectó un volumen de muestra de 2.5 mL al sistema utilizando un super-loop de 10 mL. Las fracciones se eluyeron con Tris 20 mM pH 7.4 y 1 M de NaCl en un gradiente salino diseñado experimentalmente. El método de elución que se eligió corresponde al Método IV que se muestra en la sección de resultados (Fig. 6-11 de la sección 6.3) y que se llevó a cabo como se describe a continuación:

De 0 a 20 min de corrida y a una velocidad de flujo de 2 mL/min, se eluyó la fracción de unión inespecífica con Tris 20 mM pH 7.4 sin NaCl. De 20 a 220 min, se disminuyó el flujo a 1 mL/min iniciando un gradiente salino lineal de 10 a 60 % de NaCl 1 M; de 220 a 223 min, el gradiente se aumentó linealmente de 60 a 100 % de NaCl 1 M, manteniéndose ese porcentaje y el flujo de 1 mL/min hasta los 225 min que fue el tiempo total de duración de la corrida. De esta separación, se identificaron cinco picos principales cuyas fracciones de las diferentes corridas fueron mezcladas, concentradas con el sistema Amicon y dializadas contra buffer Tris 20 mM. La fracción denominada FIII_{IEX} eluída en un gradiente de 30-40 % de NaCl 1 M, se separó con una filtración en gel utilizando una columna HiLoad Superdex 200 16/60 grado preparativo (Pharmacia-LKB Biotechnology, Sweden), previamente equilibrada y eluída con Tris 20 mM pH 7.4 y 0.2 M de NaCl. La muestra se separó en un tiempo total de corrida de 100 min a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 18 °C. Las fracciones se colectaron a 4 °C. De esta separación se identificaron tres picos que se colectaron, se concentraron y dializaron contra Tris 20 mM pH 7.4. La fracción denominada FII_{GEL}, resultó tener un mayor enriquecimiento en actividad de LCAT.

5.6. Ensayos analíticos para la identificación de LCAT

- ***Determinación de la concentración de proteína***

Esta se determinó por el método del ácido bicinconínico (Micro BCA; Pierce) (Smith *et al*, 1985) usando BSA como estándar y midiendo a una longitud de onda de 574 nm. Otras determinaciones se hicieron por fotometría de absorción de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud.

- ***Ensayo de deglicosilación***

Para detectar y comprobar la presencia de LCAT como glicoproteína en fracciones enriquecidas, éstas se sometieron a un ensayo de deglicosilación con la enzima PNGasa F (péptido-N-glicosidasa F; EC

3.5.1.52) (P7367, SIGMA), bajo las condiciones descritas por el proveedor. Se preparó una solución de proteína desnaturalizada de la fracción de interés a una concentración de 1 mg/mL como sigue: Se obtuvieron 20 µg de proteína de interés mediante precipitación con acetona; al precipitado obtenido se le adicionaron 18 µL de amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 y 2 µL de solución desnaturalizante (SDS al 0.2 % con β-mercaptoetanol 100 mM). La mezcla se incubó a 100 °C por 10 min, se dejó enfriar y se incubó con 5 µL (2.5 unidades) de solución de enzima PNGasa F (500 unidades/mL), a 37 °C por 12 h. La reacción se detuvo calentando la mezcla a 100 °C por 5 min. Los productos digeridos se evaluaron por SDS-PAGE e inmunodetección tal como se describe posteriormente.

- ***Ensayo de inmunoprecipitación***

Se llevó a cabo una preincubación de 1 h a 4 °C (pleaclaración) de 1 mg/mL de proteína total de cada fracción de interés con 50 µL de proteína G-agarosa (Millipore) diluida 1:5 en Tris-HCl 20 mM pH 7.4. La proteína G se recuperó centrifugando a 13200 rpm por 1 min. Posteriormente, se agregaron 3 µL del anticuerpo policlonal anti-LCAT (LCAT K-15, Santa Cruz Biotechnology) a cada fracción y se incubó la mezcla toda la noche a 4 °C. Después de la incubación se agregaron 70 µl de proteína G-agarosa y se incubaron por 2 h a 4 °C. Las perlas de agarosa se precipitaron con centrifugación a 13200 rpm por 15 seg y se lavaron tres veces con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4; el exceso de líquido se eliminó aspirando con una punta colibrí. La pastilla se resuspendió con 30 µl de solución Laemmli 2X y se hirvieron las muestras por 5 min. Las muestras tratadas en condiciones desnaturalizantes, se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE).

- ***Ensayos de identificación por SDS-PAGE***

La electroforesis se llevó a cabo de acuerdo con el método de Laemmli (1970), en condiciones desnaturalizantes utilizando geles separadores con 10 % de acrilamida, teñidos con azul brillante de Coomassie R-250, utilizando un marcador de peso molecular (Bio-Rad) para la determinación del peso molecular relativo. Se cargaron 30 µg de proteína total de cada

muestra, con excepción de la BSA usada como referencia de la cual se cargaron 10 µg de proteína total.

- ***Ensayos de inmunodetección (Western blot)***

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, éstas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore). La transferencia se llevó a cabo a 4 °C con agitación a 100 V por 60 min. La membrana se bloqueó con leche libre de grasas al 2.5 % preparada en amortiguador TBS-T al 0.1 % durante 1 h, a 37 °C. Para identificar las proteínas, se utilizó el anticuerpo policlonal anti-LCAT diluido 1:500 en leche al 2.5 % en TBS-T e incubado por 1 h a 37°C. Como anticuerpo secundario se usó un anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa obtenido en burro (Sta. Cruz Biotechnology) diluido 1:15000 en leche al 2.5 % en TBS-T e incubado por 1 h a 37 °C con la membrana. Entre cada paso del proceso, se realizaron cuatro lavados de 15 min cada uno con TBS-T al 0.1 %. Finalmente las proteínas se identificaron utilizando sustrato HRP quimioluminiscente (Immobilon Western, Millipore, WBKL50100).

VI. Resultados y discusión

6.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos derivados de Apo AI: DRV, KLL y VLES

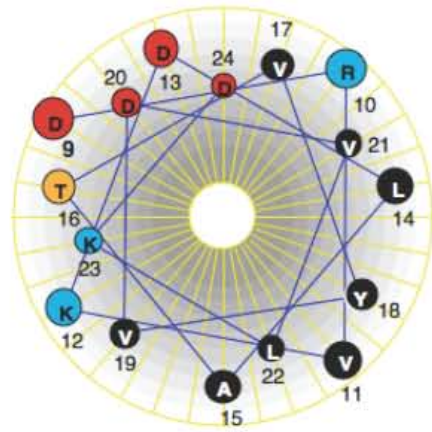
Debido a que parte del fundamento del trabajo se basa en la correlación de las características estructurales de los péptidos con su efecto fisiológico, preliminarmente se realizó el análisis de sus propiedades anfífilas, mediante el cálculo del μH y el uso de representaciones bidimensionales de las hélices α denominadas *ruedas helicoidales* (sección 5.1.1). Éstas son proyecciones de las cadenas laterales de los aminoácidos sobre un plano perpendicular al eje de la hélice, que permiten visualizar sus características generales y las posibles interacciones entre ellas (Schiffer y Edmundson, 1967). El análisis cuantitativo de la anfifilicidad de la hélice se hizo calculando el μH , que es una medida de la capacidad que puede tener la hélice de permanecer en la interfase entre un medio polar y uno no polar (Eisenberg *et al*, 1982). Característicamente, las hélices con valores de μH mayores a 0.2 kcal/mol tienen una alta capacidad de formar hélices anfipáticas (Jones *et al*, 1992), por lo que este fue el criterio tomado para el análisis de los péptidos. Otro aspecto a evaluar fue la distribución de los residuos cargados, pues se ha reportado que para que un segmento formador de hélices anfipáticas sea capaz de unirse de manera óptima a superficies lipídicas, debe presentar un grupo de residuos cargados negativamente en el centro de la cara polar y residuos básicos en la interfase polar/no polar de la hélice, características de una hélice anfipática clase A (Segrest *et al*, 1992). Las representaciones de la Fig. 6-1 permiten visualizar claramente una distribución asimétrica entre los aminoácidos polares y no polares de los segmentos DRV, KLL y VLES; esto, aunado con el alto valor de μH , corrobora las propiedades anfífilas de éstos y por tanto, su capacidad para formar hélices α .

Analizando cada uno de los segmentos, cabe hacer notar que DRV es el péptido que presenta las características ideales de unión a lípido, ya que además de ser el más anfílico ($\mu H= 0.490$ kcal/mol), tiene un claro agrupamiento de residuos cargados negativamente (aspartatos) en el centro de la cara polar de la hélice y

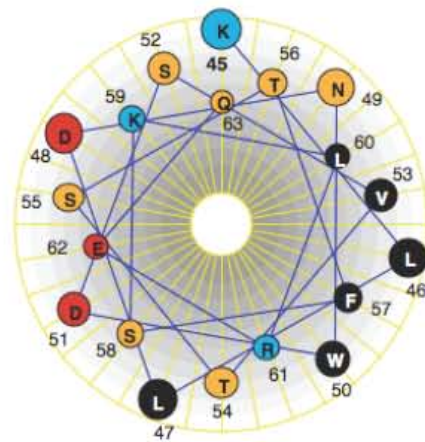
residuos básicos (arginina y lisina) en la interfase polar/no polar de la hélice anfipática. De acuerdo con la secuencia de Apo AI, este péptido forma parte de la hélice G* del dominio globular amino terminal (Fig. 1-5). El segmento KLL es el más hidrofílico (como puede verse por la abundancia de aminoácidos polares) y, aunque es el que tiene una menor distribución asimétrica de los tres ($\mu H = 0.280$ kcal/mol), presenta también aminoácidos básicos (arginina y lisina) que delimitan la cara polar de la no polar y un grupo de residuos cargados negativamente casi en el centro de la cara polar. Su secuencia corresponde a la de la primer hélice α clase A del dominio de unión a lípido. El péptido VLES, es el segmento más hidrofóbico (por abundancia de residuos no polares) y presenta mayor asimetría que KLL ($\mu H = 0.390$ kcal/mol). La distribución de residuos con carga en VLES es muy similar a la de KLL: residuos básicos en la interfase polar/no polar, y un pequeño grupo de residuos ácidos en los extremos de la cara polar. VLES es un péptido representativo del dominio carboxilo terminal que presenta una hélice α tipo Y muy especial por su alta afinidad a lípido (Fig. 6-1). La Tabla 6-1 muestra un resumen de las principales propiedades fisicoquímicas de los péptidos calculadas como lo indica la sección 5.1.

Tabla 6-1. Resumen de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos DRV, KLL y VLES derivados de Apo AI.

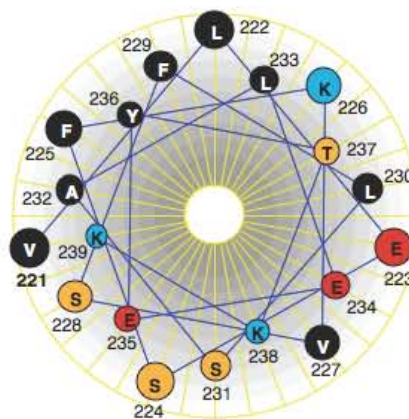
Péptido	DRV (9-24)	KLL (45-63)	VLES (221-239)
Número de aminoácidos	16	19	19
Peso molecular (Daltons)	1849.19	2267.61	2218.66
Punto isoelectrico (pI)	4.34	7.04	7.06
Coefficiente de extinción molar $\epsilon_{280nm}(M^{-1}cm^{-1})$	1280	5690	1280
μH (kcal mol ⁻¹)	0.490	0.280	0.390
Carga neta a pH 7.5	-1.01	-0.007	-0.01



A1 (9-24)
 $\mu\text{H} = 0.490 \text{ kcal/mol}$
DRV



A1 (45-63)
 $\mu\text{H} = 0.280 \text{ kcal/mol}$
KLL



A1 (221-239)
 $\mu\text{H} = 0.390 \text{ kcal/mol}$
VLES

Fig. 6-1. Representaciones de rueda helicoidal de los péptidos DRV, KLL y VLES derivados de Apo A1 y sus respectivos valores de momento hidrofóbico μH . Las letras corresponden al código de una sola letra de cada aminoácido y el código de color para cada uno de ellos es: negro= hidrofóbico, azul= carga +, rojo= carga - y amarillo= polar sin carga.

6.2. Efecto de los péptidos derivados de Apo AI con diferente tipo de estructuración sobre la actividad de LCAT en plasma

Para correlacionar el efecto de los péptidos sobre la actividad de LCAT con su estructura secundaria, ésta se determinó por dicroísmo circular (DC) (sección 5.3.) a diferentes concentraciones y en diferentes medios, con el fin de conocer el tipo de estructura secundaria que los péptidos tendrían al momento de ser introducidos al sistema de ensayo. Una vez analizadas estas características, se procedió a correlacionarlas con los cambios en la actividad de LCAT en plasma.

6.2.1. Determinación del contenido de estructura secundaria de los péptidos DRV, KLL y VLES en medio hidrofílico: Efecto sobre la actividad de LCAT

Ensayos de DC con péptidos a 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL en PBS pH 7.4

Los tres péptidos se reconstituyeron en PBS pH 7.4 para evaluar el efecto de éstos sobre la actividad de LCAT a pH fisiológico (sección 5.2.1.). Una vez reconstituidos, se evaluó el tipo de estructura secundaria que presentaban a las diferentes concentraciones que se usarían en los ensayos de actividad. Para descartar el efecto de otras variables involucradas en el ensayo, tales como la temperatura y el tiempo de incubación, se hicieron ensayos de DC a las condiciones previas del ensayo (25 °C, recién disueltos) y a las de incubación del mismo (37 °C, 5 h) (Fig. 6-2). El análisis cualitativo de los espectros, muestra que en PBS los segmentos se encuentran desestructurados bajo cualquier condición, aunque con una tendencia a formar estructuras tipo β . En cuanto al efecto de la concentración de los péptidos en la solución, conforme ésta va aumentando, los espectros van mostrando un corrimiento hacia valores mayores de longitud de onda en función de la concentración de péptido con un aumento en el contenido de estructuras desordenadas o al azar (random coil).

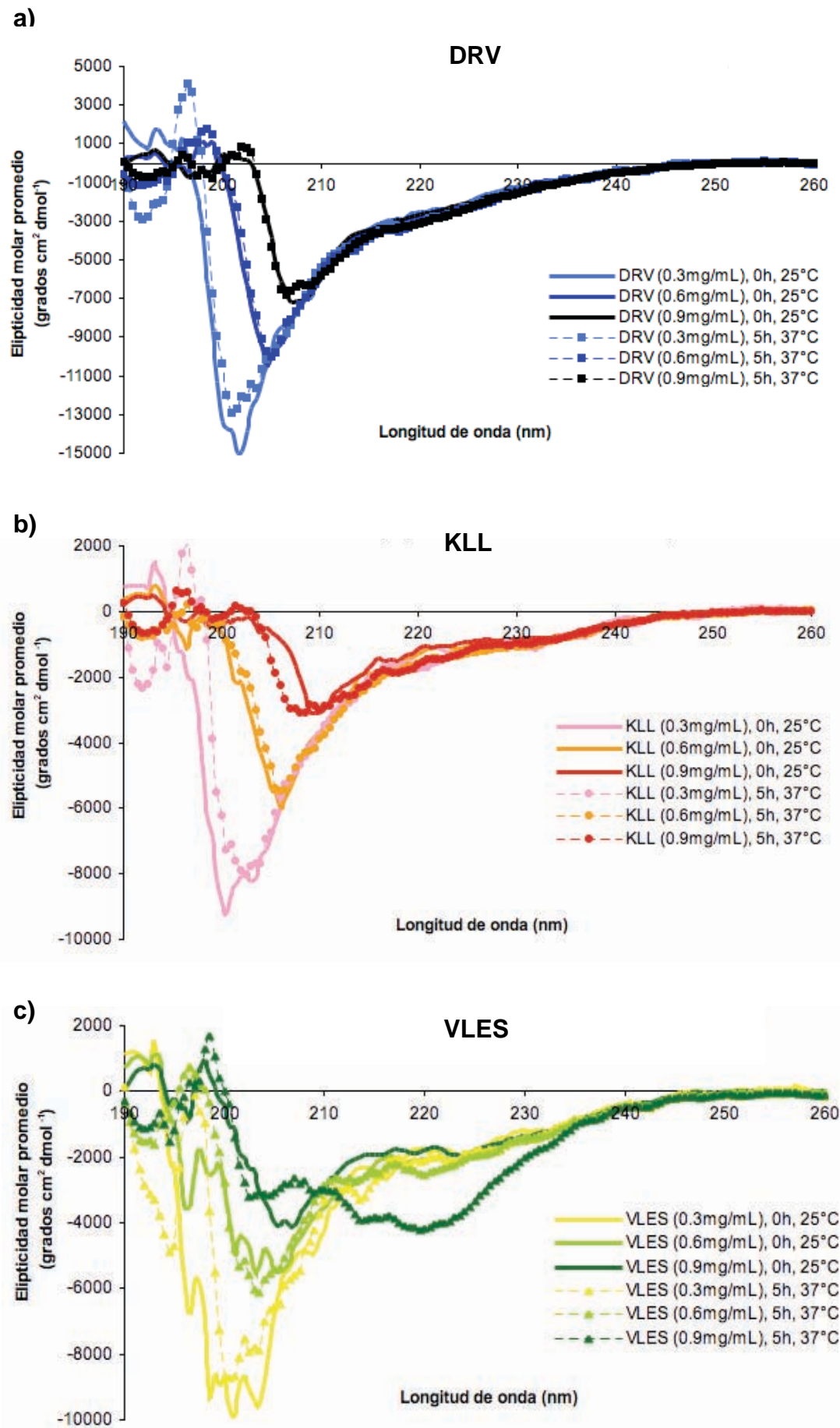


Fig. 6-2. Espectros de DC de los péptidos disueltos en PBS pH 7.4. a) DRV, b) KLL y c) VLES. Los péptidos se evaluaron a 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL, así como a t_{0h} de incubación, 25 °C (líneas continuas) y t_{5h} , 37 °C (líneas discontinuas).

La tendencia a formar estructuras β era predecible dados los problemas de agregación que impidieron reconstituir completamente los péptidos en este medio durante la preparación. El único péptido que se disolvió a las tres concentraciones fue KLL; DRV no se disolvió por completo a 0.9 mg/mL y VLES a ninguna concentración se disolvió. Cuantitativamente, los porcentajes de contenido de estructura secundaria (Tabla 6-2) muestran que a mayor concentración, el porcentaje de estructuras al azar va aumentando siendo máximo a 0.9 mg/mL. Además de presentar esta tendencia a desestructurarse, los péptidos tuvieron otro alto porcentaje de estructuración en hojas β (del 36 a 45 %) y un contenido de hélice α que varió del 16 al 20 %.

Con fines de comparación, estos cálculos se repitieron utilizando los programas SELCON3, CONTIN/LL y CDSSTR incluidos en el paquete CDPro y descritos en la sección 5.3. Los resultados que se muestran en el Apéndice 2, permitieron corroborar que los péptidos presentan un alto contenido de estructuras β y al azar en medio acuoso y que estas tendencias se conservan utilizando cualquier programa de predicción de estructura secundaria. Para completar el análisis de los espectros de DC, los datos se analizaron nuevamente con el paquete CDPro pero considerando un intervalo de longitud de onda de 200 a 260 nm. Esta modificación se hizo con la finalidad de descartar los datos obtenidos al final del espectro a longitudes de onda muy bajas (menores de 200 nm) a las que es muy probable tener lecturas poco confiables con una cantidad alta de ruido (Whitmore y Wallace, 2007). Los resultados (Apéndice 2) muestran que aún cuando las tendencias antes descritas se conservan, los datos parecen ser más refinados cuando no se consideran los datos de la región de 190 a 200 nm, ya que nos permiten observar diferencias más claras entre el contenido de estructuras β y al azar que las obtenidas al considerar un intervalo de longitud de onda de 195 a 260 nm (Tabla 6-2). Aún cuando es claro que el considerar o no dicha región sí altera los resultados en cuanto a su grado de refinamiento, no lo hace en cuanto a las tendencias del contenido de estructura secundaria de los péptidos, por lo que en este caso es válido considerar ambos análisis. Con respecto al efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la estructuración de los péptidos, los espectros obtenidos a 25 y 37 °C (Fig. 6-2) y

Tabla 6-2. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI disueltos en PBS pH 7.4, a diferentes condiciones de concentración, temperatura y tiempo de incubación.

Conc.		0.3 mg/mL			0.6 mg/mL			0.9 mg/mL		
Péptido		% α	% β	% AI azar	% α	% β	% AI azar	% α	% β	% AI azar
T= 25 °C (0 h)	DRV	19.7	37.7	34.9	20.0	35.6	38.2	18.2	38.3	42.5
	KLL	17.0	42.6	40.5	17.2	40.7	43.1	15.9	43.3	46.8
	VLES	16.4	44.6	40.5	16.9	41.9	42.7	17.0	40.8	44.4
T= 37 °C (5 h)	DRV	20.8	35.0	35.0	20.2	34.9	38.4	18.5	37.6	42.4
	KLL	18.0	39.7	40.3	17.3	40.5	43.4	16.5	41.8	46.0
	VLES	17.3	41.6	40.7	17.7	39.7	42.2	17.7	38.7	44.1

*Los porcentajes mostrados fueron calculados de 195 a 260 nm, que fue el rango más amplio posible de longitud de onda y con totales aproximados al 100 %. Los % β corresponden a la suma de los porcentajes de hojas β paralelas y antiparalelas. Todos los cálculos se hicieron con el software CDNN (sección 5.3.).

el análisis cuantitativo de su contenido de estructura secundaria, sugieren que tales variables no tienen un efecto significativo sobre dicha estructuración, pues ésta se conserva incluso después de las 5 h de incubación a 37 °C. Así, con estos controles de estructura secundaria, cualquier efecto de estos péptidos sobre la actividad de LCAT, pudo ser atribuida con certeza a la presencia del péptido y no a cualquier otra variable involucrada en el ensayo de actividad.

Ensayos de actividad de LCAT en plasma con péptidos a 0.3 y 0.6 mg/mL en PBS pH 7.4

Con la finalidad de evaluar el cambio de actividad de LCAT en presencia de los péptidos derivados de Apo AI disueltos en medio acuoso, se hicieron ensayos cinéticos con éstos a 0.3 y 0.6 mg/mL. El ensayo a 0.9 mg/mL no fue posible realizarlo debido a las problemas que se presentaron en su disolución. La Fig. 6-3, muestra un experimento representativo de varios ensayos de actividad de LCAT en presencia de los péptidos a 0.3 mg/mL, a diferentes intervalos de tiempo. Como puede observarse, el incremento de la producción de ésteres de colesterol en presencia de los péptidos presenta un comportamiento hiperbólico que presenta un valor máximo a las 2.5 h aproximadamente, tiempo después del cual las curvas llegan a ser asintóticas. En comparación, la actividad basal de

LCAT en plasma utilizada como control, muestra un comportamiento hiperbólico que alcanza una producción máxima de 0.918 pmol hasta las 5 h de incubación, manteniéndose alrededor de ese valor incluso hasta las 10 h de ensayo, periodo de tiempo en el que tampoco los péptidos mostraron cambios de actividad (resultados no mostrados). En cuanto a la producción máxima de ésteres de colesterol, los péptidos muestran un incremento de hasta el 50.5 % (en el caso de VLES) con respecto al plasma control (Tabla 6-3). Entre los diversos factores que pudieron haber afectado el curso de la reacción a valores mayores de 2.5 h, se encuentran la inhibición de LCAT por acumulación de producto, el agotamiento de sitios disponibles de la enzima y la consecuente disminución de su eficiencia catalítica a tiempos largos de incubación, la desnaturalización y pérdida de su conformación óptima o de la de alguno de sus cofactores por efecto de la temperatura o de la presencia de intermediarios inhibidores de la reacción, etc. Dado que no es posible saber con certeza cuáles de estos factores afectaron el curso de la reacción y que las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el ensayo de actividad no permiten tener control sobre algunas de las variables involucradas en el mismo, para hacer un estudio cinético fue necesario considerar sólo aquella región de las curvas de saturación en las que cualquiera de los factores mencionados anteriormente, no tuvieran efecto considerable sobre la producción de ésteres de colesterol en este sistema de ensayo. De esta forma, los cambios en el comportamiento cinético se cuantificaron calculando la velocidad inicial de la reacción (V_0), a partir del valor de la pendiente de la recta de la región lineal de la curva, correspondiente al periodo de incubación de 0 a 1 h. En la Fig. 6-3b se puede observar que aún cuando los tres péptidos presentan valores de V_0 mayores a los del plasma, tanto VLES como KLL a 0.3 mg/mL, tienen un efecto activador similar sobre el aumento en la rapidez de la reacción de LCAT (123 y 117 %, respectivamente) que es mayor en comparación con el que presenta DRV (48.4%). De estos resultados, resumidos en la Tabla 6-3 y en la Fig. 6-5, es importante resaltar que en general los tres péptidos tienen un efecto activador sobre LCAT, pues favorecen tanto que se alcance una mayor cantidad de producto formado en un menor periodo de tiempo, como que los valores de V_0 de la reacción de LCAT sean mayores que el que presenta la enzima en condiciones normales.

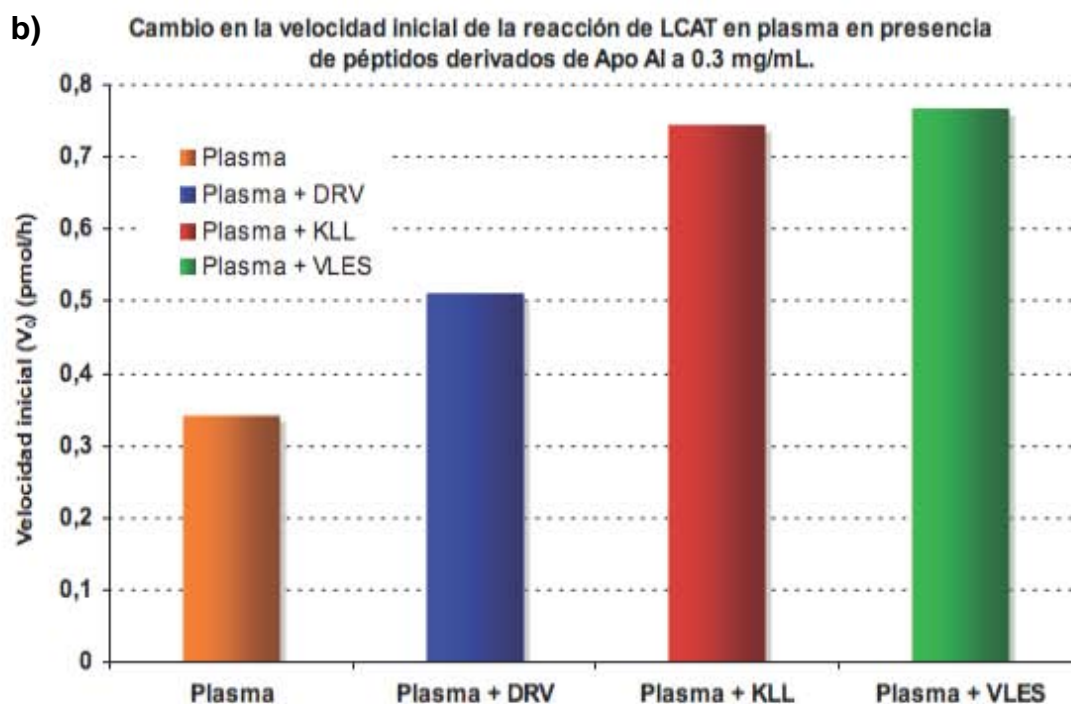
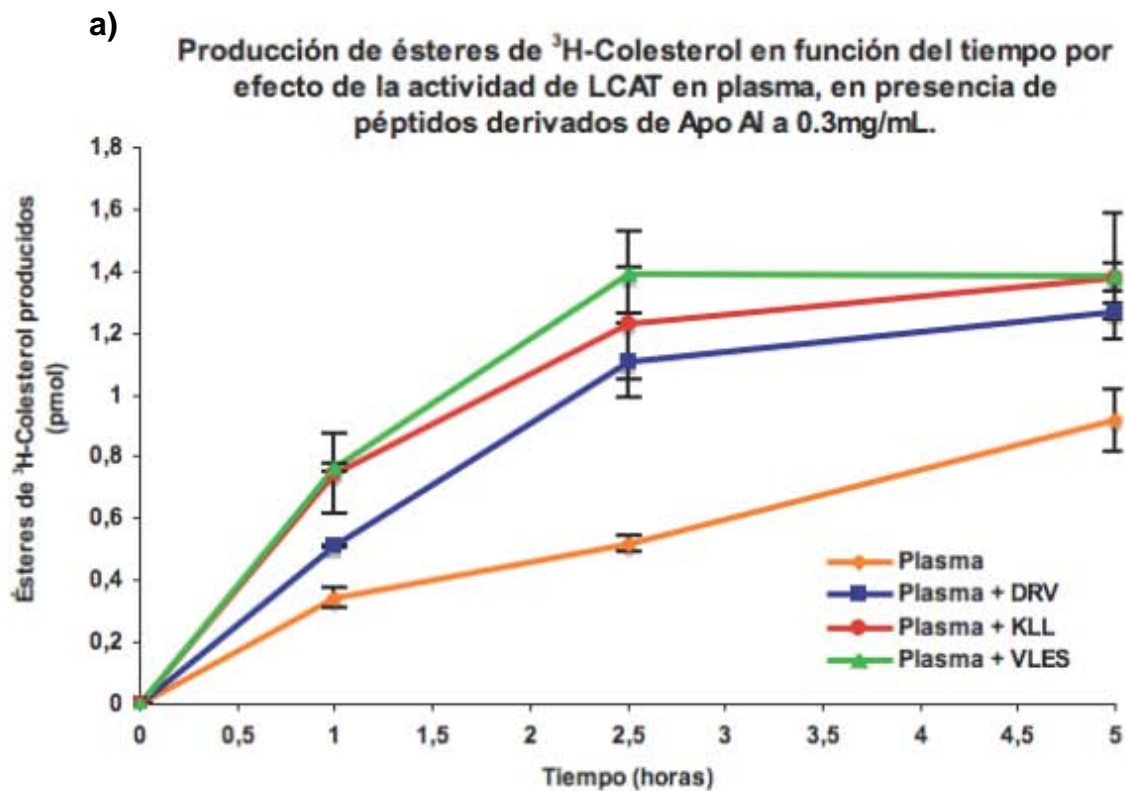


Fig. 6-3. Cambio en la actividad de LCAT en presencia de los péptidos derivados de Apo AI disueltos en PBS pH 7.4 a 0.3 mg/mL. a) Curva de saturación de la reacción catalizada por LCAT en presencia de los péptidos a 0.3 mg/mL. b) Cambio en la velocidad inicial (V_0) de reacción de LCAT, determinada a partir del valor de la pendiente de la región lineal de la curva correspondiente al intervalo de 0 a 1 h de incubación. Código de colores: naranja= plasma (P); azul= P+DRV; rojo= P+KLL y verde= P+VLES.

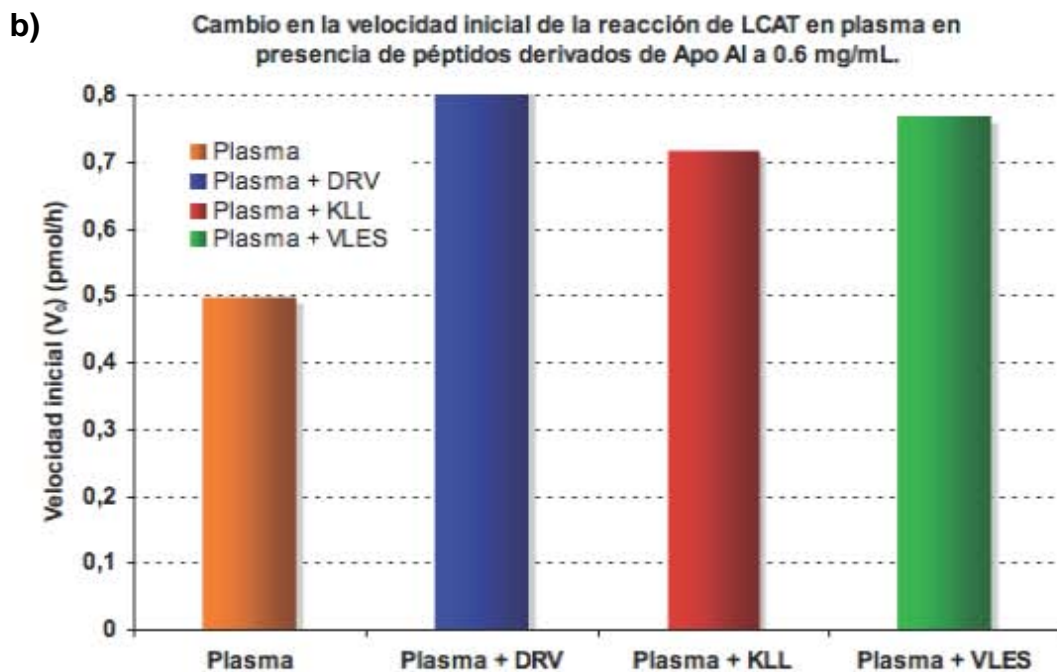
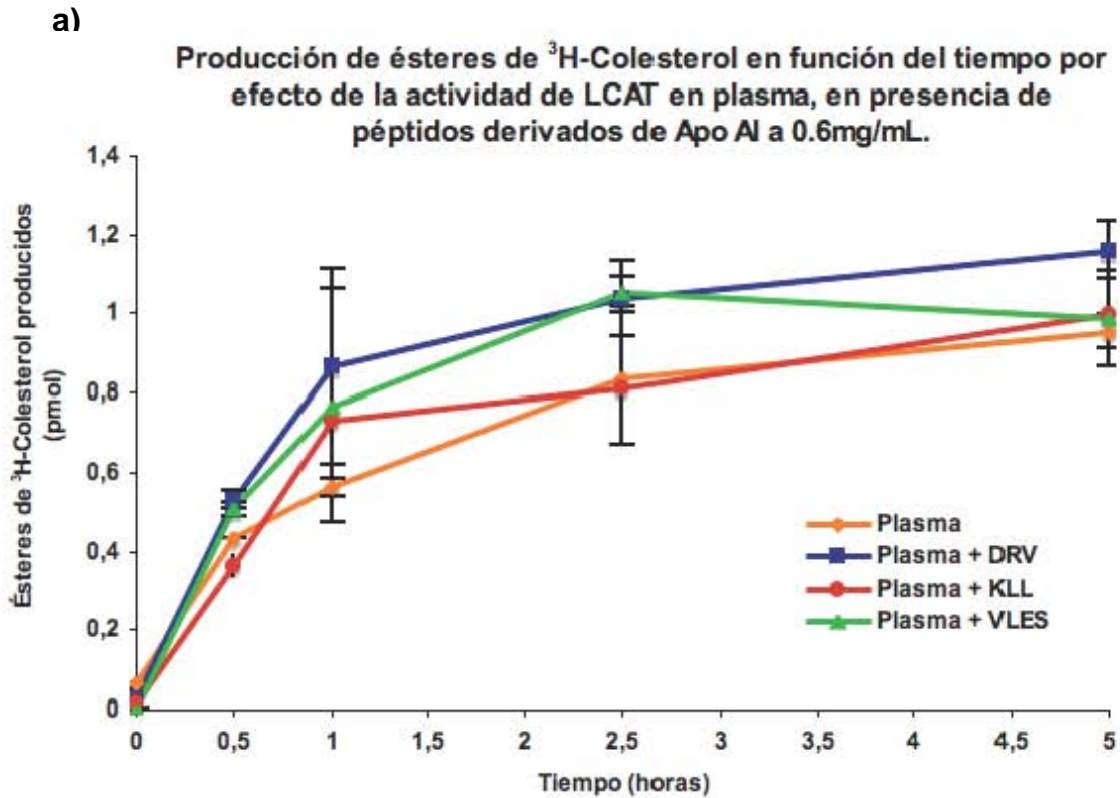


Fig. 6-4. Cambio en la actividad de LCAT en presencia de los péptidos derivados de Apo AI disueltos en PBS pH 7.4 a 0.6 mg/mL. a) Curva de saturación de la reacción catalizada por LCAT en presencia de los péptidos a 0.6 mg/mL b) Cambio en la velocidad inicial (V_0) de reacción de LCAT, determinada a partir del valor de la pendiente de la región lineal de la curva correspondiente al intervalo de 0 a 1 h de incubación. El código de colores es el mismo de la Fig. 6-3.

Tabla 6-3. Resumen de los parámetros obtenidos de las curvas de saturación de la reacción catalizada por LCAT en plasma en presencia de péptidos derivados de Apo A1 a diferentes concentraciones.

Conc.	0.3 mg/mL				0.6 mg/mL			
	pmol máximos (5 h)	% aumento pmol máximos*	V ₀ (pmol/h)**	% aumento V ₀	pmol máximos (5 h)	% aumento pmol máximos*	V ₀ (pmol/h)**	% aumento V ₀
Plasma	0.918	0	0.343	0	0.954	0	0.498	0
P+DRV	1.269	38.2	0.509	48.4	1.161	21.7	0.839	68.5
P+KLL	1.377	50.0	0.743	117.0	0.998	4.6	0.717	44.0
P+VLES	1.382	50.5	0.765	123.3	0.987	3.5	0.768	54.2

*Es el número de pmol producidos a las 5 h de incubación, bajo las condiciones descritas en la sección 5.4. ** La V₀ corresponde al valor de la pendiente de la recta obtenida en la región de la curva de 0 a 1 h de incubación, mediante un ajuste lineal en EXCEL.

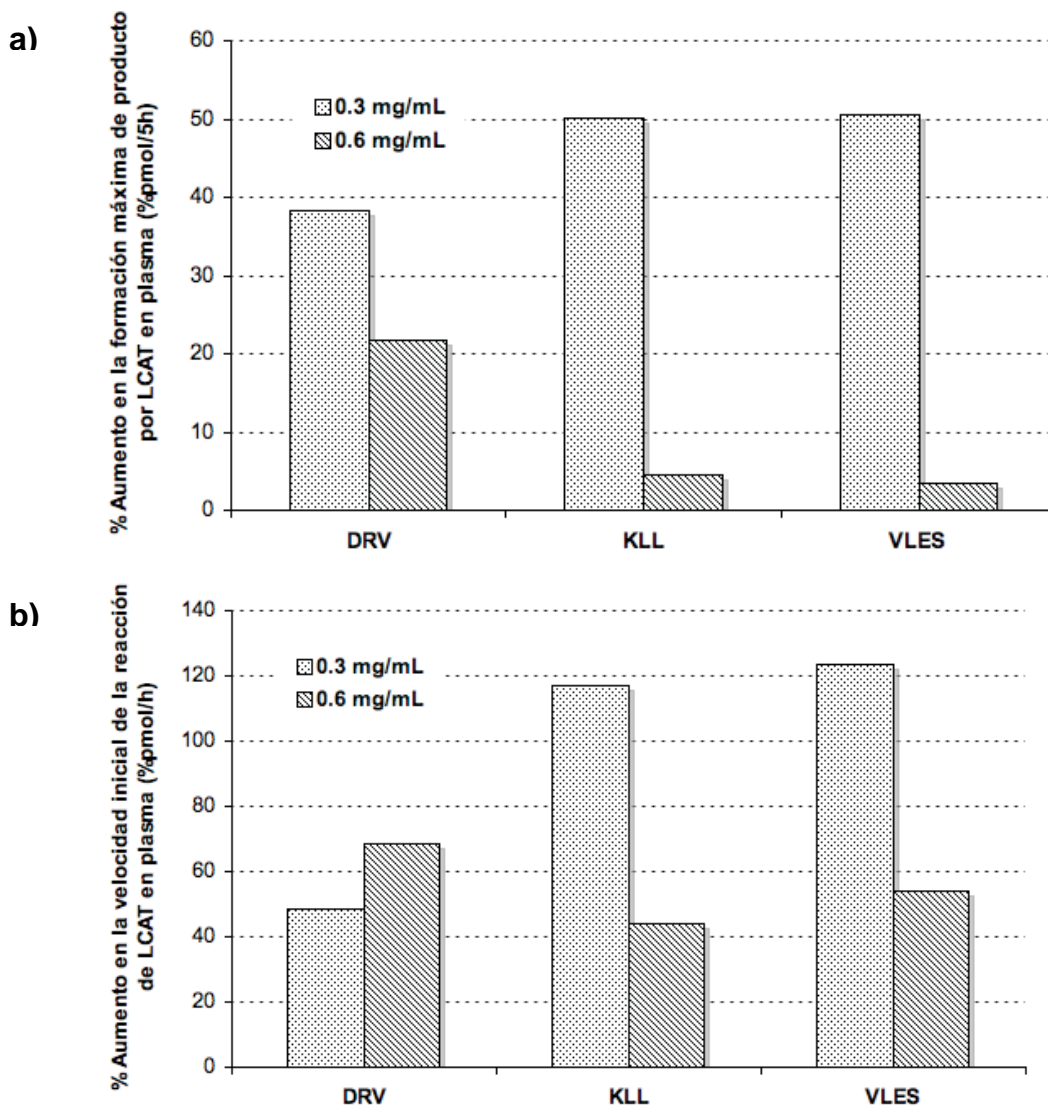


Fig. 6-5. Comparación del efecto de la concentración de los péptidos derivados de Apo A1 sobre la actividad de LCAT en plasma. a) % Aumento en la formación máxima de producto y b) % Aumento en la velocidad inicial de la reacción de LCAT.

En lo que respecta a los ensayos con péptidos a 0.6 mg/mL, este aumento de concentración mostró cambios importantes en cuanto a su grado de activación (Fig. 6-4). Tal como en el caso anterior, todas las curvas muestran un comportamiento hiperbólico que parece alcanzar su valor máximo de producción hasta aproximadamente las 5 h de incubación (Fig. 6-4a). Al igual que a 0.3 mg/mL, a 0.6 mg/mL los tres péptidos fueron capaces de activar LCAT pues favorecieron tanto un aumento en la formación máxima de producto como la V_0 de la reacción de LCAT en plasma. A diferencia del primer ensayo, en estas condiciones DRV fue más eficaz como activador que los péptidos VLES y KLL, los cuales nuevamente presentaron un comportamiento similar entre ellos. Sin embargo, el grado de activación de DRV sobre la reacción de LCAT fue mucho menor que el que presentaron los péptidos a 0.3 mg/mL: el aumento máximo en la formación de producto que presentó DRV (21.7 %) fue de poco menos de la mitad de la cantidad máxima alcanzada a 0.3 mg/mL por VLES, el máximo activador a 0.3 mg/mL (Tabla 6-3 y Fig. 6-5a). El efecto causado sobre la V_0 de la reacción, fue muy parecido al de la formación máxima de producto. Aún cuando en todos los casos los péptidos presentan un valor mayor de la pendiente de la región lineal comprendida entre 0 y 1 h de incubación con respecto al plasma normal, este aumento fue de 68.5% como máximo (en el caso de DRV), mientras que a 0.3 mg/mL, se alcanzó casi el doble en presencia de VLES (Tabla 6-3 y Fig. 6-5b). Cabe hacer notar que el valor de V_0 para DRV fue el único parámetro que se vio favorecido con el aumento de concentración, es decir, DRV a 0.6 mg/mL presentó un valor más alto de V_0 que a 0.3 mg/mL.

Así, es claro que estos péptidos activan bajo condiciones controladas de concentración que, de ser rebasadas, disminuyen su eficiencia. Aún cuando no se han hecho los experimentos para demostrarlo, es probable que un aumento de concentración de estos péptidos podría incluso llegar a inhibir la reacción de LCAT (Fig. 6.5). El efecto inhibitorio de péptidos de este tipo, ha sido ya estudiado por investigadores como Owens *et al* (1990) en un sistema totalmente diferente que consiste en el análisis de la fusión celular inducida por el Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH) y que da lugar a la formación del sincitio (masa celular gigante multinucleada), una de las manifestaciones típicas de la enfermedad. Este estudio demostró que tanto la Apo A1 como péptidos análogos

de ésta, muestran un efecto inhibitor sobre la formación del sincitio inducido por el VIH y que además este efecto inhibitorio es dosis-dependiente. Aún cuando los investigadores no elucidaron el mecanismo de inhibición observado, ellos proponen que los péptidos anfipáticos podrían haber perturbado la organización y propiedades fusogénicas de la membrana viral y/o de la membrana celular. Considerando el comportamiento que presentan péptidos anfipáticos derivados de Apo AI en este tipo de estudios, podría sugerirse que para el caso de la disminución de la activación de LCAT en concentraciones altas de péptido, pudo haberse presentado un fenómeno similar en el que un exceso de moléculas anfipáticas con alta afinidad a superficies lipídicas, se acumularan sobre la superficie de las HDL, impidiendo estéricamente la unión de LCAT a éstas y por tanto, el inicio de la reacción enzimática. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, sería necesario completar este análisis cinético de activación por acción de los péptidos en plasma, para obtener parámetros como $V_{m\acute{a}x}$ y K_m que nos dieran información sobre el tipo de activación (o inhibición) que éstos ejercen sobre la reacción de LCAT. Asimismo, análisis cinéticos con preparaciones enriquecidas y/o purificadas de LCAT, permitirían maximizar los efectos producidos y asignarlos con toda certeza a la acción de la enzima *per se*, descartando las interferencias debidas al conjunto de proteínas y demás moléculas contenidas en el plasma.

Con respecto al mecanismo por el cual este tipo de péptidos tienen la capacidad de activar LCAT, Bonelli y Jonas (1989) han propuesto que el principal papel de estas hélices puede ser el de alterar la interfase agua-fosfolípido para exponer a LCAT el sustrato embebido, sin embargo, no han podido explicar qué fenómenos están involucrados en dicha alteración. Con la finalidad de dar una posible explicación a los mecanismos reguladores de dichos fenómenos, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en analizar el tipo de cambios estructurales que las moléculas de tipo anfipático presentan en medios caracterizados por presentar interfases polares/no polares. Previamente hemos demostrado que cuando una apolipoproteína intercambiable (como Apo AI) es colocada en una interfase aire/agua (análoga a la superficie de las lipoproteínas) conocida como monocapa de Langmuir, la Apo se confina hacia la interfase, mostrando cambios conformacionales importantes cuando el sistema es expuesto a un aumento en la

presión lateral (Bolaños-García *et al*, 2001). Extrapolando dichos cambios al sistema biológico en cuestión, la alta presión lateral correspondería a aquella a la que están sometidas todas las Apos y proteínas accesorias cuando forman parte de una HDL discoidal naciente pobre en lípido. Conforme la HDL naciente cambia de forma y aumenta de tamaño por la acumulación de ésteres de colesterol en su núcleo, experimenta una disminución en dicha presión lateral con los correspondientes cambios conformacionales y ajustes intermoleculares de las Apos (Xicohtencatl-Cortes *et al*, 2004). Experimentos similares con Apo C1, mostraron que además de que uno de sus segmentos (el carboxilo terminal) respondió a cambios de presión lateral, éste cambió su conformación de un estado desestructurado a otro estructurado en hélice α en presencia de lisofosfolípidos, hecho que se propuso podría corresponder a una transición conformacional reguladora de tipo desorden-orden dependiente del medio externo que los péptidos “sensan” (Mendoza-Espinosa *et al*, 2008).

Los resultados de activación de LCAT por péptidos derivados de Apo AI, podrían estar correlacionados con el tipo de estructura secundaria que éstos adoptan cuando están expuestos no sólo a cambios de presión lateral (como parte del complejo de la HDL naciente), sino también a un ambiente lipídico específico capaz de regular su comportamiento. Como vimos en los espectros de DC de la Fig. 6-2, aun cuando los péptidos estaban desordenados antes de ser incluidos en el sistema de ensayo, éstos fueron capaces de activar LCAT, independientemente de que uno de los requerimientos de los activadores de la reacción de LCAT es el de presentar una estructura anfipática tipo hélice α . Así, dado que el efecto activador se presentó tal como si los péptidos hubieran cumplido los requerimientos citados, podríamos sugerir de manera preliminar, que estos segmentos aún cuando inicialmente están desestructurados, son capaces de “sensar” el ambiente lipídico de su medio de reacción, cambiar su estructuración a hélice α y cumplir eficientemente su papel activador. Experimentos con los péptidos en una conformación controlada como los que se muestran en la siguiente sección, fueron necesarios para comprobar esta hipótesis.

**6.2.2. Determinación del contenido de estructura secundaria de los péptidos DRV, KLL y VLES en concentraciones variables tanto de péptido como de Liso-C₁₂PC:
Efecto sobre la actividad de LCAT**

Ensayos de DC en presencia de los péptidos a 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL, reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30, 60 y 90 mM, respectivamente.

Diversas moléculas de tipo anfipático con propiedades detergentes y solventes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el trifluoroetanol (TFE), así como algunos fosfolípidos, han sido usados en estudios estructurales para inducir y estabilizar la estructura secundaria en hélice α de diversos péptidos (Montserret *et al*, 2000). De manera particular, en el estudio con péptidos derivados de la Apo CI, se demostró que los porcentajes de estructuración en hélice α más altos, se obtuvieron con péptidos en presencia de SDS y de Liso-C₁₂PC por encima de su concentración micelar crítica (cmc = 0.9 mM) y en una proporción péptido:Liso-C₁₂PC 1:200 (mol:mol) (Mendoza-Espinosa *et al*, 2008), con la ventaja de que el lisofosfolípido forma parte de los sistemas biológicos.

Tomando estos datos como primera aproximación, se prepararon los péptidos a 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL en una relación proporcional de Liso-C₁₂PC 30, 60 y 90 mM, respectivamente, para mantener la proporción péptido:lípido 1:200 (sección 5.2.2.). Los resultados obtenidos (Fig. 6-6) muestran que a diferencia de la Fig. 6-2, los espectros de DC de los péptidos a 0.3 y 0.6 mg/mL reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30 y 60 mM, respectivamente, presentan claramente la forma de "W" con mínimos alrededor de 208 y 222 nm característicos de estructuras α -helicoidales. El efecto de la concentración de la preparación causa una pérdida proporcional de la estructura secundaria tipo hélice α ; sin embargo, no se puede saber si esa pérdida es debida al aumento de la concentración del péptido o del lisofosfolípido. Los datos de la Tabla 6-4 corroboran un aumento de aproximadamente el doble de porcentaje de hélice α de los péptidos en estas condiciones con respecto al que presentaron en medio acuoso (Tabla 6-2).

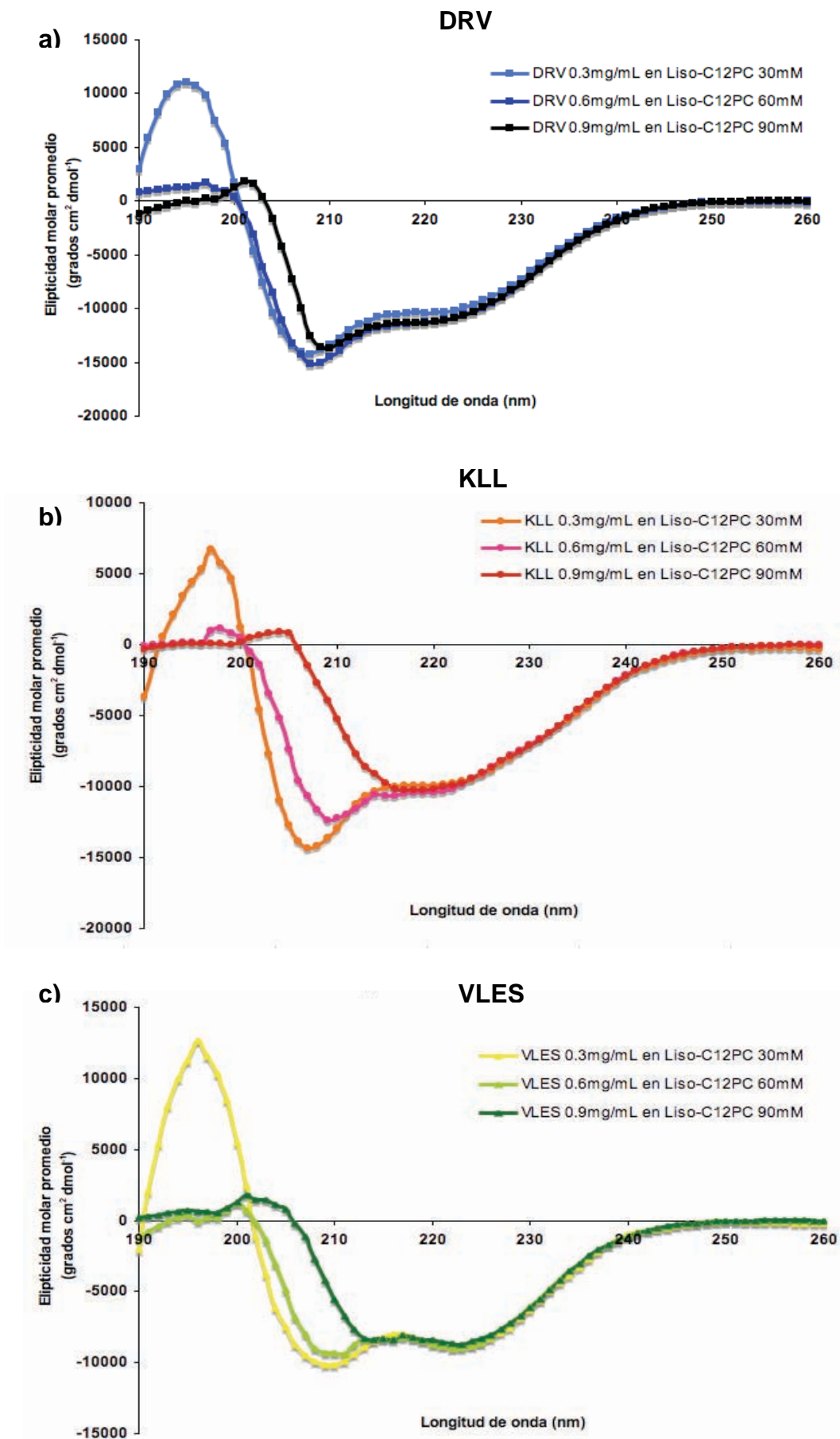


Fig. 6-6. Espectros de DC de los péptidos a) DRV, b) KLL y c) VLES a concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30, 60 y 90 mM, respectivamente.

Tabla 6-4. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI reconstituidos a diferentes concentraciones en Liso-C₁₂PC.

Conc.	0.3 mg/mL en Liso 30mM			0.6 mg/mL en Liso 60mM			0.9 mg/mL en Liso 90mM		
	Péptido	% α	% β	% AI azar	% α	% β	% AI azar	% α	% β
DRV	34.5	17.4	27.9	29.9	21.3	30.0	25.9	24.7	36.1
KLL	31.3	20.0	29.6	26.2	24.9	34.6	20.6	31.5	44.3
VLES	30.2	20.3	34.1	22.9	28.9	38.7	19.9	32.7	44.8

Los porcentajes mostrados fueron calculados de 195 a 260 nm, que fue el rango más amplio posible de longitud de onda y con totales aproximados al 100%. Los % β corresponden a la suma de los porcentajes de hojas β paralelas y antiparalelas. Todos los cálculos se hicieron con el software CDNN (sección 5.3.2). Los ensayos se llevaron a cabo a 25 °C.

También se observa que conforme la concentración aumenta, este porcentaje de hélice α disminuye con un correspondiente aumento en el contenido de estructuras no ordenadas y de tipo β . Aunque esta tendencia se mantiene en todos los péptidos, VLES es siempre el que presenta mayor tendencia a desordenarse, mientras que DRV es el que presenta una mayor capacidad de mantener su estructura en hélice α , aún con altas concentraciones de péptido. Cabe mencionar que una incubación de 5 h a 37 °C de las preparaciones, no tiene efecto sobre el tipo de estructuración de los mismos (sección 6.2.1). Tal como en el ensayo en medio acuoso, los datos se analizaron con los programas de CDPro para confirmar que también empleando otros algoritmos, se presenta la misma tendencia en el aumento del contenido de estructuras ordenadas de tipo hélice α (Apéndice 3). Asimismo, se recalculó el contenido de estructura secundaria de los péptidos descartando la región de 190 a 200 nm con la finalidad de evaluar el efecto de la concentración de la preparación sobre la estructuración de los péptidos sin considerar la señal del máximo a 195 nm que claramente disminuye en los espectros a medida que dicha concentración aumenta. Como puede observarse (Apéndice 3), cuando esa región de bajos valores de λ no se considera, los valores de hélice α aumentan y las diferencias con respecto a otros tipos de estructuras, se vuelven más significativas. Estos resultados indican que si la señal de 195 nm está presente como un máximo en el espectro de DC y se considera dentro del cálculo, la predicción se ve favorecida hacia un alto contenido de estructuras hélice α . Si por otro lado dicha señal no está presente y se considera dentro del cálculo, los valores de hélice α

se ven disminuidos y por tanto las diferencias de este tipo de estructura con respecto a las de tipo β o al azar, son menos significativas. Aún cuando la discusión final de los resultados se hizo considerando el intervalo de longitud de onda más amplio posible (de 195 a 260 nm con el programa CDNN, Tabla 6-4), con esta información se demostró que las tendencias se conservan independientemente del software empleado y de los criterios considerados dentro del análisis de los datos y que el grado de estructuración de los péptidos puede llegar incluso a ser más alto que el hemos estado considerando dependiendo de dicho tratamiento.

Ensayos de actividad de LCAT en plasma en presencia de los péptidos a 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL reconstituidos en Liso-C₁₂PC a 30, 60 y 90 mM, respectivamente.

Una vez definido el tipo de estructura de los péptidos en Liso-C₁₂PC a las concentraciones citadas, se procedió a correlacionarla con su efecto sobre la actividad de LCAT. A partir de esta sección, los experimentos se hicieron incubando la mezcla de reacción durante 5 h ya que ese fue el tiempo al cual se obtuvo una producción máxima de ésteres de colesterol por acción de LCAT (sección 6.2.1). Como control de la reacción se determinó la actividad basal de LCAT en plasma (sección 5.4) mientras que como control del medio de reconstitución de los péptidos, se utilizó el Liso-C₁₂PC a las diferentes concentraciones de trabajo. La Fig. 6-7 y la Tabla 6-5 muestran los resultados obtenidos. Al hacer los experimentos controles con Liso-C₁₂PC a las diferentes concentraciones de reconstitución de los péptidos, se observó que este lípido tuvo efectos inhibitorios drásticos sobre la actividad de LCAT a medida que su concentración se aumentó, conservándose la actividad basal del plasma sólo a 30 mM de Liso-C₁₂PC, disminuyendo hasta un 52 % a 60 mM y abatiéndose completamente a 90 mM. Aún cuando el efecto inhibitorio de la lisofosfatidilcolina sobre la actividad de LCAT ha sido ya reportado en la literatura, los mecanismos propuestos para explicar este fenómeno han sido muy variados.

Algunos autores proponen que la inhibición por lisolecitinas es debida a efectos detergentes más que a inhibición por producto final, pues éstas tienen el mismo efecto inhibitorio que el Triton X-100, efecto que es reversible en ambos casos por adición de albúmina al medio (Smith y Kuksis, 1980). Otros investigadores han reportado que además de sus efectos detergentes, el Liso-C₁₂PC puede competir con el colesterol libre por el mismo número de grupos acilo, al ser ambos aceptores de acilos y por tanto inhibidores competitivos de la reacción de LCAT (Liu y Subbaiah, 1993); la reacción en la que está involucrada la acilación del lisofosfolípido para formar fosfolípido por acción de LCAT, es denominada LAT (Lisolecitina Acil Transferasa) y es dependiente de la presencia de LDLs (Subbaiah, 1986). Aún cuando existen diversas propuestas sobre el mecanismo de acción de los lisofosfolípidos, los datos que tenemos no nos permiten asegurar cuál fue el mecanismo que causó el abatimiento total de la reacción de LCAT o si fueron varios de ellos, sin embargo, es muy probable que las propiedades surfactantes del lisofosfolípido hayan causado la partición o “solubilización” del sustrato (que en este caso son las HDLs y en menor grado las LDLs) , dejándolo en una fase no disponible e inaccesible para la enzima (Stafford y Dennis, 1988).

En cuanto al efecto de los péptidos sobre la reacción de esterificación de LCAT, éstos mostraron un comportamiento similar al control a una concentración de 0.3 mg/mL en Liso-C₁₂PC 30 mM, mientras que a concentraciones más altas no presentaron ningún efecto activador o de reversibilidad de la inhibición por Liso-C₁₂PC. Tan sólo DRV fue capaz de resistir el efecto inhibitorio presentando un 5.6 % de actividad. Estos resultados muestran claramente que bajo estas condiciones la reacción de LCAT es inhibida incluso en presencia de los péptidos derivados de Apo AI y que muy probablemente la pérdida en su efecto activador está correlacionada con su pérdida de estructura tipo α y un aumento de su tendencia a agregarse conforme la concentración tanto del lisofosfolípido como del péptido en la preparación van aumentando.

Efecto sobre la actividad de LCAT en plasma de los péptidos derivados de Apo AI en Liso-C₁₂PC en concentraciones variables de péptido y lípido.

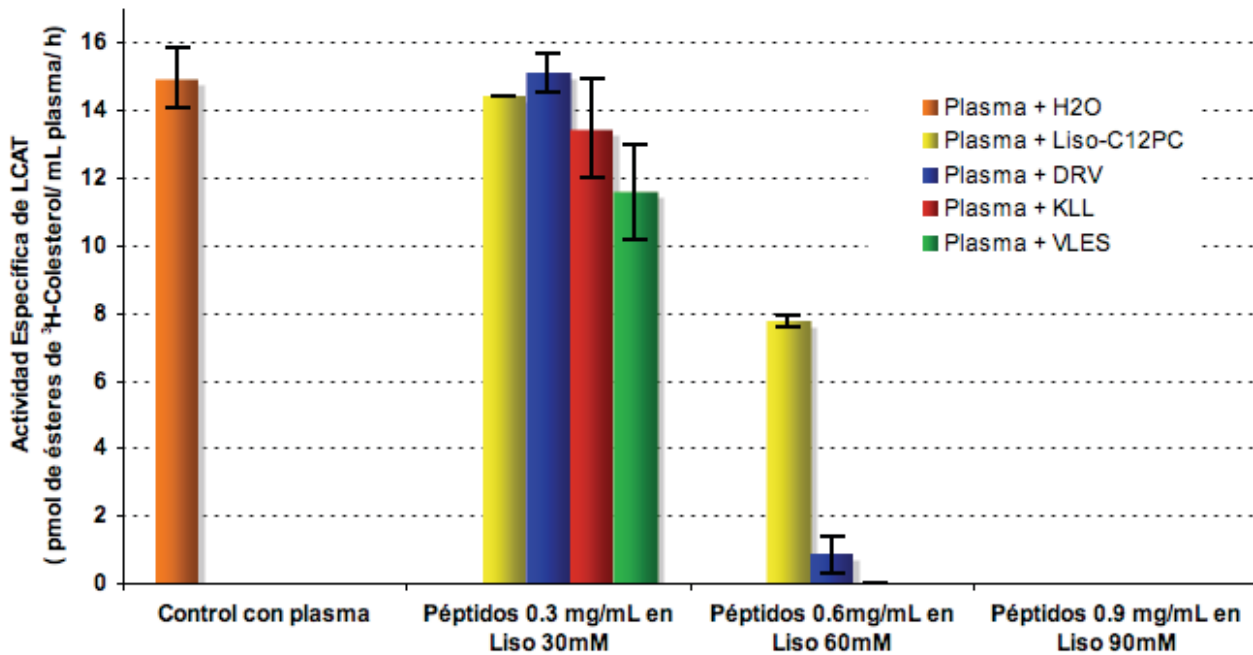


Fig. 6-7. Cambio en la producción máxima de ésteres de colesterol por acción de LCAT en plasma, en presencia de los péptidos DRV (azul), KLL (rojo) y VLES (verde) a concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30, 60 y 90mM, respectivamente. El control de actividad basal de LCAT en plasma se muestra en naranja y el de el efecto del Liso-C₁₂PC sin péptido, en amarillo. Las determinaciones se hicieron a 37 °C a un tiempo de incubación de 5 h.

Tabla 6-5. Comparación de la actividad específica de LCAT basal con la obtenida en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos de Apo AI reconstituidos en concentraciones crecientes de Liso-C₁₂PC.

Actividad Específica (pmol ésteres de ³ H-Colesterol/mL plasma/h)*						
Conc.	Liso 30mM	Liso 60mM	Liso 90mM	0.3 mg/mL en Liso 30mM	0.6 mg/mL en Liso 60mM	0.9 mg/mL en Liso 90mM
Péptido						
Plasma	14.398 (-3.7%)	7.759 (-48.1%)	0 (-100%)			
P + DRV				15.099 (+1%)	0.834 (-94.4%)	0 (-100%)
P + KLL				13.456 (-10%)	0 (-100%)	0 (-100%)
P + VLES				11.579 (-22.5%)	0 (-100%)	0 (-100%)
Plasma + H₂O (control): 14.95 pmol/mL/h = 100% actividad						

* Determinada con 7 µL de plasma a las 5 h de incubación a 37 °C. Entre paréntesis se muestra la diferencia de los porcentajes de actividad obtenidos con las diferentes muestras al comparar con la actividad basal de LCAT en plasma + H₂O, como el 100 %. El signo negativo indica en qué porcentaje se ve reducida la actividad de LCAT, mientras que el signo positivo indican en qué porcentaje aumentó.

6.2.3. Determinación del contenido de estructura secundaria de los péptidos DRV, KLL y VLES a diferentes concentraciones en Liso-C₁₂PC 30mM: Efecto sobre la actividad de LCAT

Ensayos de DC con los péptidos a 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL, reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30 mM.

En los experimentos de la sección anterior, se observó que aún cuando el Liso-C₁₂PC tiene la capacidad de estructurar los péptidos derivados de Apo AI en una conformación tipo hélice α , una concentración mayor a 30 mM tiene un efecto inhibitorio drástico sobre la reacción de LCAT y muy probablemente sobre la estructuración de los péptidos. Para comprobar si en dichas preparaciones la pérdida de estructura tipo hélice α se debió al aumento de la concentración de lisofosfolípido o a la del péptido, se hicieron preparaciones con diferentes concentraciones de los péptidos reconstituidos en 30 mM de Liso-C₁₂PC, concentración a la cual los péptidos mostraron un alto contenido de hélice α y la conservación de la actividad de LCAT (sección 6.2.2). Los espectros de DC de estos ensayos (Fig. 6-8), muestran que a la concentración constante de Liso-C₁₂PC de 30 mM, es posible mantener a los tres péptidos estructurados en hélice α , conservando los valores característicos de sus mínimos a 208 y 222 nm, aún en altas concentraciones de péptido. No obstante, el análisis cuantitativo del contenido de estructura secundaria de estas preparaciones (Tabla 6-6) muestra que también en este caso hay una pérdida de su estructuración en hélice α , directamente proporcional al aumento de la concentración del péptido y estrechamente relacionada con la disminución del máximo de longitud de onda de 195 nm de los espectros de DC (Fig. 6-8). Al igual que en los ensayos de la sección 6.2.2., conforme la concentración de péptido aumentó y la estructura tipo α disminuyó, los porcentajes de estructuras β y al azar aumentaron. Con este experimento quedó demostrada la tendencia de estos péptidos a agregarse conforme su concentración aumenta, independientemente de su medio de reconstitución.

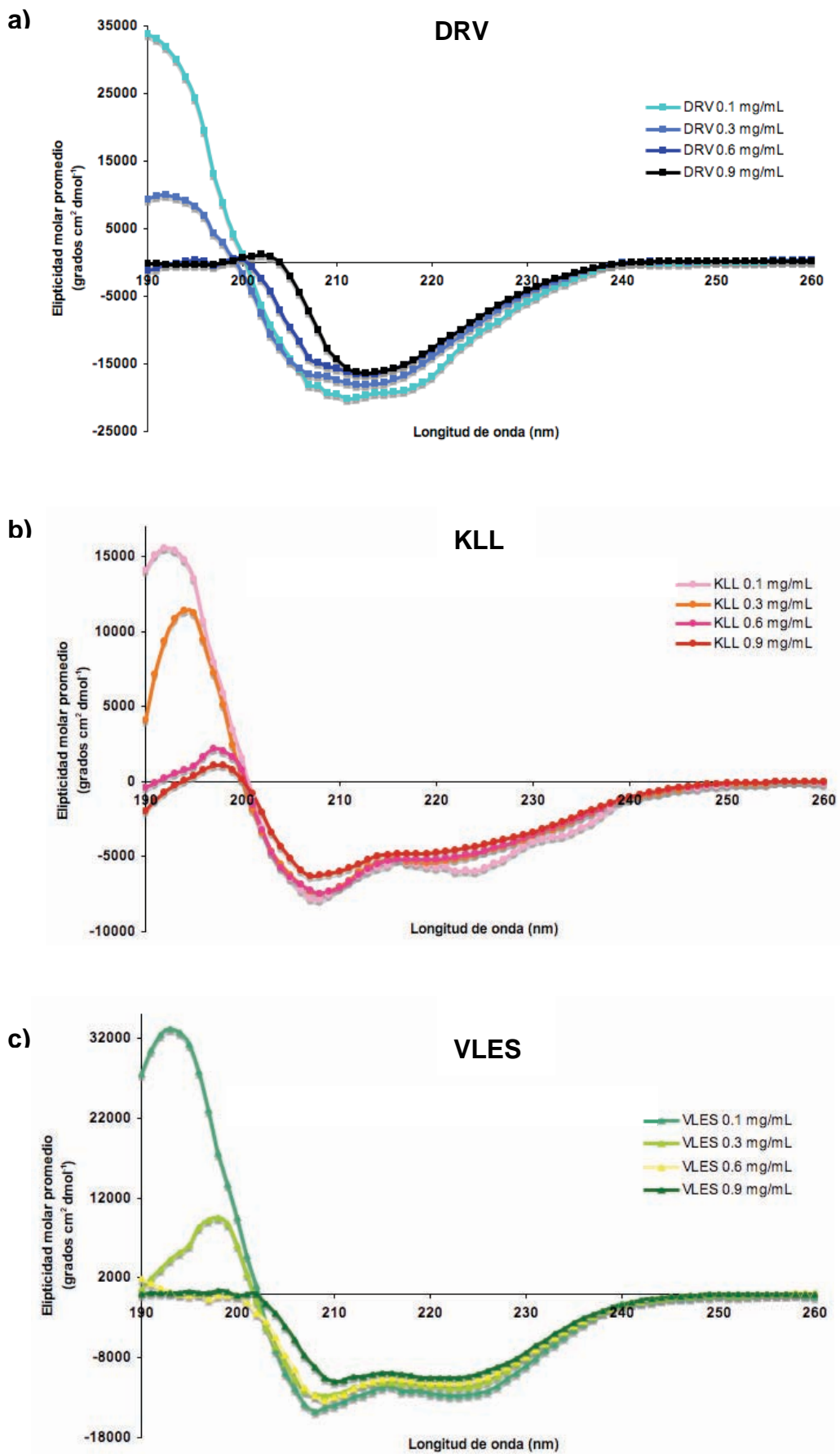


Fig. 6-8. Espectros de DC de los péptidos a) DRV, b) KLL y c) VLES a concentraciones de 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL, reconstituidos en Liso- C_{12}PC 30 mM.

Cabe mencionar que aún cuando los tres péptidos muestran las mismas tendencias generales, DRV y VLES presentan un comportamiento similar en cuanto a que ambos presentan los más altos porcentajes de hélice α y una mayor tendencia a permanecer ordenados cuando son reconstituidos en Liso- $C_{12}PC$ 30 mM. Como en los ensayos anteriores, al analizar los resultados con CDPro en un intervalo de λ de 190 a 260 nm, fue posible verificar que el uso de distintos algoritmos sobre la determinación de la estructura secundaria no tiene mayor efecto sobre los resultados obtenidos al utilizar el programa CDNN. Sin embargo, cuando se descarta la zona de ruido (190 a 200 nm) dentro del cálculo, las diferencias entre los diferentes tipos de estructuras son más significativas y por tanto más claras (Apéndice 4). En este caso la conformación de los péptidos en hélice α predomina incluso hasta en una concentración de 0.6 mg/mL con valores más altos que los que se obtienen considerando dicha región dentro del cálculo. Cabe resaltar que este hecho es bastante notorio en el caso de los péptidos DRV y VLES, cuyos valores de contenido de hélice α se encuentran alrededor del 40 % a concentraciones de 0.6 mg/mL de péptido. En cuanto a KLL este es el péptido que presenta los más bajos porcentajes de hélice α incluso a bajas concentraciones. Esto indica que su baja afinidad a lípido le impide ser capaz de estructurarse en hélice α con tan sólo 30 mM de lisofosfolípido, a diferencia de los otros dos péptidos que aún a 0.6 mg/mL presentan altos valores de estructuración α -helicoidal. Tal como se ha mencionado, aún descartando la región de 190 a 200 nm, se tiene que a concentraciones altas de péptido (0.9 mg/mL), éstos pierden su estructura hélice α incluso en presencia de Liso- $C_{12}PC$ 30 mM. Sin embargo, la pérdida de estructura no es tan drástica como en el ensayo de la sección 6.2.2, sino que más bien se presenta una especie de equilibrio entre los tres tipos de estructuras analizadas (Apéndice 4). Con estos resultados es posible sugerir que el lisofosfolípido es capaz de estabilizar a los péptidos en una conformación ordenada, dependiendo tanto de su concentración como de la afinidad del péptido por superficies lipídicas. De esta forma, en concentraciones saturantes de Liso- $C_{12}PC$ (sección 6.2.2, Apéndice 3), los péptidos presentan menor contenido de estructuras al azar que cuando están reconstituidos en Liso- $C_{12}PC$ 30 mM, pues una concentración más baja de éste no es capaz de mantener en estado ordenado (hélices α u hojas β) concentraciones altas de péptido.

Tal como puede observarse, las tendencias mostradas al inicio de esta discusión se conservan aún manejando el tratamiento de los datos mediante la variación de los algoritmos y del intervalo de longitud de onda empleado para las determinaciones. No obstante, este análisis se hizo con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos con el programa CDNN, dando mayor certidumbre a los resultados reportados y por tanto, a las conclusiones que deriven del presente trabajo.

Tabla 6-6. Contenido de estructura secundaria de diferentes concentraciones de los péptidos derivados de Apo AI, reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30 mM

Conc.	0.1 mg/mL en Liso 30 mM			0.3 mg/mL en Liso 30 mM			0.6 mg/mL en Liso 60 mM			0.9 mg/mL en Liso 90 mM		
	%α	%β	% AI azar	%α	%β	% AI azar	%α	%β	% AI azar	%α	%β	% AI azar
DRV	49.8	9.6	17.7	38	15.7	21.8	30.1	21.5	28.4	25.8	25.1	34.9
KLL	25.7	25.4	36.6	24.4	27.2	37.2	21.3	32.2	39.2	19.9	34.4	41.0
VLES	46.8	10.4	25.3	32.4	18.5	31.8	26.6	24.5	33.8	24.1	27.0	37.8

Los porcentajes mostrados fueron calculados de 195 a 260 nm y con totales aproximados al 100%. Los % β corresponden a la suma de los porcentajes de hojas β paralelas y antiparalelas. Todos los cálculos se hicieron con el software CDNN (sección 5.3.2). Los ensayos se llevaron a cabo a 25 °C.

Ensayos de actividad de LCAT en plasma en presencia de los péptidos a 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30 mM.

Una vez comprobado que los péptidos estaban estructurados en hélice α en el sistema de ensayo, se procedió a evaluar su efecto sobre la actividad de LCAT. A diferencia de los ensayos anteriores, en éste se incluyó un experimento con péptido a 0.1 mg/mL.

Como puede observarse en la Fig. 6-9, los péptidos a esta concentración no tuvieron la capacidad de aumentar la producción de ésteres de colesterol por acción de LCAT, pues presentaron un porcentaje de producción similar al de los controles de actividad basal en plasma con agua y con Liso-C₁₂PC 30 mM (del 93 al 103%). La Tabla 6-7 muestra los porcentajes de actividad de LCAT de todos los ensayos realizados con péptidos en lisofosfolípido 30 mM.

En general, el mayor efecto activador de los péptidos, se tuvo a 0.3 y a 0.6 mg/mL, sin embargo, dependiendo de la concentración, uno u otro péptido presentó mayor o menor porcentaje de aumento. Cuando el tratamiento se hizo con péptidos a 0.3 mg/mL, VLES mostró un aumento de casi el 30 % de actividad, siguiéndole DRV con un 14 % y finalmente KLL con un 8.3 % más, con respecto al control. Por otro lado, a una concentración de 0.6 mg/mL, la actividad de LCAT fue aumentada por DRV, KLL y VLES, en un 27, 21 y 17 %, respectivamente. Finalmente, a 0.9 mg/mL todos los péptidos mostraron un aumento de actividad de menos del 20 % en la que no se observan cambios significativos individuales.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en medio hidrofílico (sección 6.2.1.), observamos que las tendencias obtenidas son muy similares. A una concentración de 0.3 mg/mL, el aumento máximo en la producción de ésteres de colesterol correspondió a VLES, mientras que a una concentración de 0.6 mg/mL, el porcentaje máximo se obtuvo por efecto de DRV. No obstante, la concentración óptima a la cual estos segmentos fueron capaces de aumentar tanto la V_0 de la reacción de LCAT como la producción máxima de ésteres de colesterol fue a 0.3 mg/mL, ya que los valores de estos parámetros fueron mucho mayores que a 0.6 mg/mL, con cualquiera de los tres péptidos (con excepción de DRV a 0.6 mg/mL) (Fig. 6-5). Otro dato importante que cabe resaltar, es que bajo estas condiciones tanto VLES como KLL muestran un comportamiento similar en cuanto a su grado de activación. Esto puede explicarse debido a que cada uno de ellos forma parte de las hélices α 1 y 10, respectivamente, del segmento de unión a lípido de la Apo AI (Fig. 1-5). Como se mencionó previamente, se ha propuesto que estas hélices están directamente involucradas en la asociación con la HDL y que probablemente se encargan de anclar a LCAT a la lipoproteína (Zannis *et al*, 2006).

Efecto sobre la actividad de LCAT en plasma de los péptidos derivados de Apo AI a diferentes concentraciones en Liso-C₁₂PC 30mM.

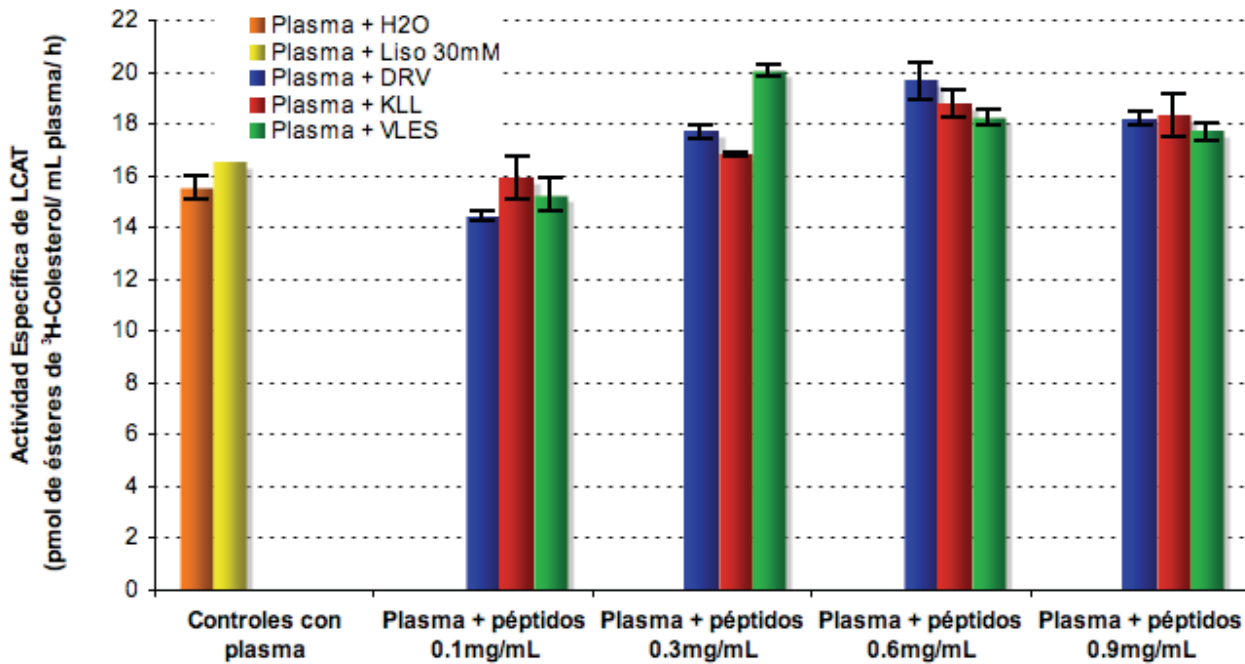


Fig. 6-9. Cambio en la producción máxima de ésteres de colesterol por acción de LCAT en plasma, en presencia de los péptidos DRV (azul oscuro), KLL (rojo) y VLES (verde) a concentraciones de 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30 mM. El control de actividad basal de LCAT en plasma se muestra en naranja y el del Liso-C₁₂PC 30 mM en amarillo. Las determinaciones se hicieron a 37°C y con un tiempo de incubación de 5h.

Tabla 6-7. Comparación de la actividad específica de LCAT basal con la obtenida en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos de Apo I reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30 mM.

Actividad Específica (pmol ésteres de ³H-Colesterol/mL plasma/h) *				
Conc. Péptido	0.1 mg/mL en Liso 30 mM	0.3 mg/mL en Liso 30 mM	0.6 mg/mL en Liso 30 mM	0.9 mg/mL en Liso 30 mM
P + DRV	14.407 (-7.1%)	17.681 (+14%)	19.652 (+26.7%)	18.173 (+17.1%)
P + KLL	15.896 (+2.5%)	16.8 (+8.3%)	18.771 (+21%)	18.319 (+18%)
P + VLES	15.25 (-1.7%)	20.04 (+29.2%)	18.216 (+17.4%)	17.67 (+13.9%)
Plasma + H₂O (control):	15.516 pmol/mL/h = 100%			
Plasma + Liso 30 mM:	16.486 pmol/mL/h (+6.3%)			

* Determinada con 7 µL de plasma a las 5 h de incubación a 37 °C. Entre paréntesis se muestra la diferencia de los porcentajes de actividad obtenidos con las diferentes muestras al comparar con la actividad basal de LCAT en plasma + H₂O, como el 100 %. El signo negativo indica en qué porcentaje se ve reducida la actividad de LCAT, mientras que el signo positivo indican en qué porcentaje aumentó.

De esta manera, es factible proponer que el mecanismo por el cual estos péptidos son capaces de aumentar tanto la V_0 de la reacción de LCAT como su eficiencia, está estrechamente relacionada con la capacidad que éstos tienen de unirse a lípido y de cambiar su conformación como parte de un mecanismo modulador. Asimismo, estos resultados nos permiten confirmar la propuesta discutida en la sección 6.2.1, en la que sugerimos que las propiedades fisicoquímicas y estructurales de estos segmentos de Apo AI están directamente relacionadas con su capacidad de activar la reacción de LCAT, presentando un posible mecanismo regulado por cambios estructurales de los activadores dependientes del medio de reacción. Así, aún cuando los péptidos estaban desordenados en medio acuoso antes de incluirse en el sistema de ensayo, éstos tuvieron la capacidad de incrementar tanto la V_0 de reacción de LCAT como la producción máxima de ésteres de colesterol (sección 6.2.1).

Dado que con estos ensayos no era posible asegurar si ese efecto había sido debido a cambios estructurales de los péptidos dentro del medio, se procedió a controlar su estructura con preparaciones en Liso- $C_{12}PC$ 30 mM, concentración a la cual era posible mantener a los tres péptidos en conformación hélice α sin inhibir la actividad de LCAT (sección 6.2.2). Los resultados obtenidos mostraron que, efectivamente, los segmentos estructurados fueron capaces de activar LCAT a las concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/mL, con las mismas tendencias que cuando se introdujeron desordenados. De esta manera, puede sugerirse que los péptidos desordenados una vez formando parte del complejo sistema de ensayo, fueron capaces de “sensar” el ambiente lipídico propiciado por las lipoproteínas del medio, sufrir una transición conformacional reguladora de tipo desorden-orden e incrementar la eficiencia de la reacción de LCAT. Es importante señalar que este tipo de activación es probablemente un fenómeno general aplicable a cualquier tipo de hélice α que sea capaz de cumplir con los requerimientos de activación de LCAT mencionados previamente (sección 6.2.1). Sin embargo, cambios sutiles de activación pueden ser atribuidos a propiedades específicas de los péptidos tales como su anfifilicidad y su capacidad de unión a lípido.

En cuanto a estas propiedades individuales de los péptidos, en el presente trabajo quedó demostrado que DRV y VLES caracterizados por presentar altos valores de μH y alta afinidad por superficies lipídicas, fueron aquellos que mostraron un mayor potencial activador de la reacción de LCAT, aunque a diferentes concentraciones. DRV fue el más efectivo entre todos los péptidos a una concentración de 0.6 mg/mL, mientras que VLES lo fue a 0.3 mg/mL.

Los resultados demostraron que el efecto activador de estos segmentos es dependiente de la concentración: a bajas concentraciones (0.1 mg/mL), los péptidos no provocan cambio alguno en la reacción de LCAT aún cuando su contenido de hélices α es muy alto, mientras que a concentraciones altas (0.9 mg/mL), los péptidos ya no presentan más incremento en la actividad de LCAT, presentándose así una pérdida en su eficiencia como activadores (sección 6.2.1) y una probable tendencia a actuar como inhibidores.

El efecto negativo de las altas concentraciones de los péptidos sobre la reacción de LCAT, probablemente se debe a que su presencia impide la unión de la enzima con su sustrato en un mecanismo detergente (como el que se presentó con el Liso- $C_{12}PC$) y/o porque bajo esas concentraciones son incapaces de sufrir las transiciones desorden-orden necesarias para activar la reacción de LCAT. Esta última propuesta es la más factible dado que los resultados del presente trabajo demostraron que el aumento en la concentración de los péptidos, causa una pérdida de estructuras α y un incremento en su contenido de estructuras β y al azar que conducen probablemente a una agregación de los mismos (tal como se observó en los espectros de DC y en los problemas de disolución de los mismos). Bajo este supuesto, y estableciendo que la concentración óptima a la cual los péptidos actúan como activadores de la reacción de LCAT es de 0.3 mg/mL (por los altos valores de V_0 y de producción máxima) podría proponerse que VLES es el péptido que debido a su alta afinidad a lípido y su capacidad de reestructuración de una estructura desordenada a una de tipo hélice α , es el que presenta una mayor eficiencia como activador de LCAT.

6.3. Purificación de LCAT: método final

Diversos protocolos para purificar LCAT a partir de plasma humano han sido reportados desde la década de los 70s, sin embargo, la baja concentración de esta proteína en plasma, la similitud que presenta en algunas de sus propiedades fisicoquímicas como PM y pl con la albúmina de suero humano (HSA, proteína más abundante en plasma), su alto grado de glicosilación y consecuente diversidad de isoformas, así como la alta inestabilidad que presentan fracciones enriquecidas, han sido todos ellos factores determinantes que han impedido encontrar un método de purificación claro y adecuado para aislar LCAT a homogeneidad a partir de plasma, con altos rendimientos y protocolos rápidos y reproducibles. Varios de estos procedimientos fueron probados y modificados durante el proceso de purificación (los resultados se muestran en el Apéndice 5), sin embargo, no fue posible tener resultados contundentes que aseguraran la presencia de LCAT en las fracciones finales. Considerando todos estos factores, fue necesario diseñar otro protocolo tomando en cuenta lo siguiente:

- *LCAT es una proteína muy poco abundante en plasma;* la concentración reportada de LCAT en plasma ha sido de 5 a 6 $\mu\text{g/mL}$ (Jonas, 1998). Diversos trabajos han reportado que a partir de sus diversos protocolos de purificación, obtienen una cantidad aprox. de 0.5 mg de LCAT partiendo de 1 L de plasma (70 g de proteína total). Así, considerando que en los protocolos iniciales partimos de una baja cantidad de plasma (180 mg de proteína total aproximadamente), es probable que la proteína de interés se haya perdido durante el proceso de purificación.
- *Es indispensable monitorear con un ensayo de actividad cada uno de los pasos de purificación;* haberse basado únicamente en propiedades tan comunes en muchas proteínas como son el peso molecular, el punto isoeléctrico y el grado de glicosilación partiendo de una muestra tan compleja, fue insuficiente para monitorear a la proteína en cada uno de los pasos involucrados en los diversos protocolos probados.

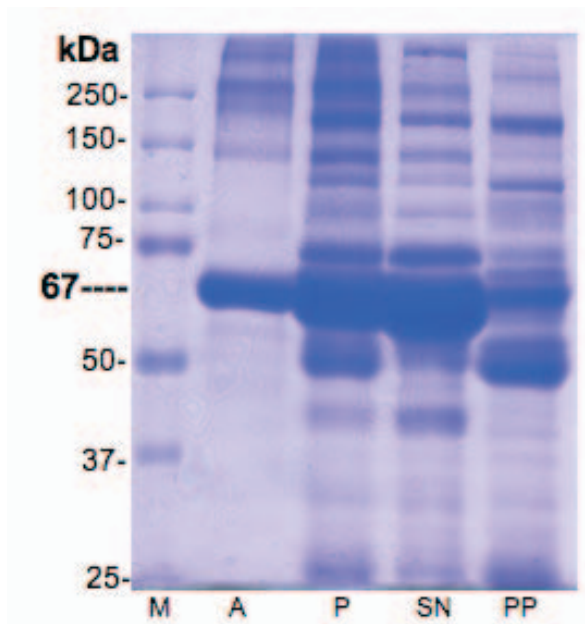
Tomando en cuenta lo citado anteriormente, en este último protocolo se partió de un volumen de 1 L de plasma para tener una cantidad de proteína total suficiente que permitiera llegar a los últimos pasos de purificación sin perder la proteína de interés. En casos como este donde se parte de una muestra altamente compleja, fue necesario incluir un primer paso de *aclaramiento* en el que se eliminara la mayor cantidad posible de material particulado antes de iniciar las cromatografías. La precipitación con sulfato de amonio fue el método de elección para este fin. En la Fig. 6-10a se observa que después de este paso, hubo un enriquecimiento de la banda de 67 kDa en el sobrenadante, el cual presentó además la mayor parte de la actividad de LCAT (un 95 % con respecto a la actividad total en plasma). Por otro lado, el precipitado descartado presentó apenas un 12 % de actividad y un enriquecimiento tanto de bandas de entre 100 y 200 kDa como de las de 50 y 25 kDa (Fig. 6-10a). Por lo tanto, con este paso se eliminaron principalmente proteínas de alto peso molecular así como inmunoglobulinas, proteínas altamente abundantes en plasma cuyo perfil de separación bajo condiciones desnaturalizantes da lugar a un enriquecimiento en las bandas de 50 y 25 kDa.

Posteriormente, el sobrenadante fue sometido a una cromatografía de intercambio aniónico, técnica que además de ofrecer una alta resolución, permite separar a partir de altos volúmenes de muestra, gracias a la alta capacidad de carga de este tipo de resinas. Para este segundo paso se fueron probando diversas variables tales como fuerza iónica, flujo y tiempo de corrida, hasta definir las condiciones óptimas en las que se tuviera una mayor resolución.

La Fig. 6-11 muestra los cromatogramas obtenidos a partir de los diferentes métodos probados. El Método IV descrito en la sección 5.5, fue el que finalmente se eligió para llevar a cabo esta separación, ya que bajo estas condiciones se logró aumentar la resolución de los picos cromatográficos. En la Fig. 6-11 se observa el perfil cromatográfico y las fracciones obtenidas en este paso de purificación por los cuatro métodos probados. La fracción que tuvo mayor actividad de LCAT fue la FIII (Fig. 6-12c), la cual presentó una notable disminución de proteínas contaminantes, principalmente de aquellas con peso

molecular de alrededor de 73 y 67 kDa eliminadas en la FI y FII, respectivamente (Fig. 6-12b).

a)



b)

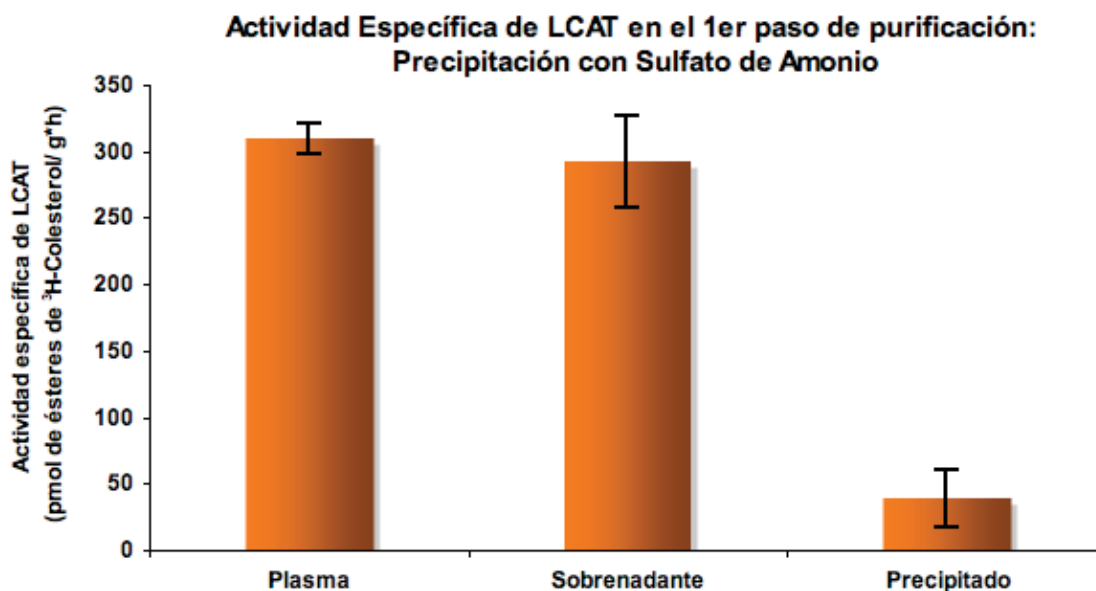


Fig. 6-10. Primer paso de purificación de LCAT a partir de plasma humano: Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. a) Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie después de un ensayo SDS-PAGE donde se observan las proteínas presentes tanto en el sobrenadante como en el precipitado después de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. b) Ensayo de actividad de LCAT en dichas fracciones. M= marcador de peso molecular (kDa); A= Albúmina Sérica Bovina (BSA); P= Plasma; SN= sobrenadante; PP= precipitado.

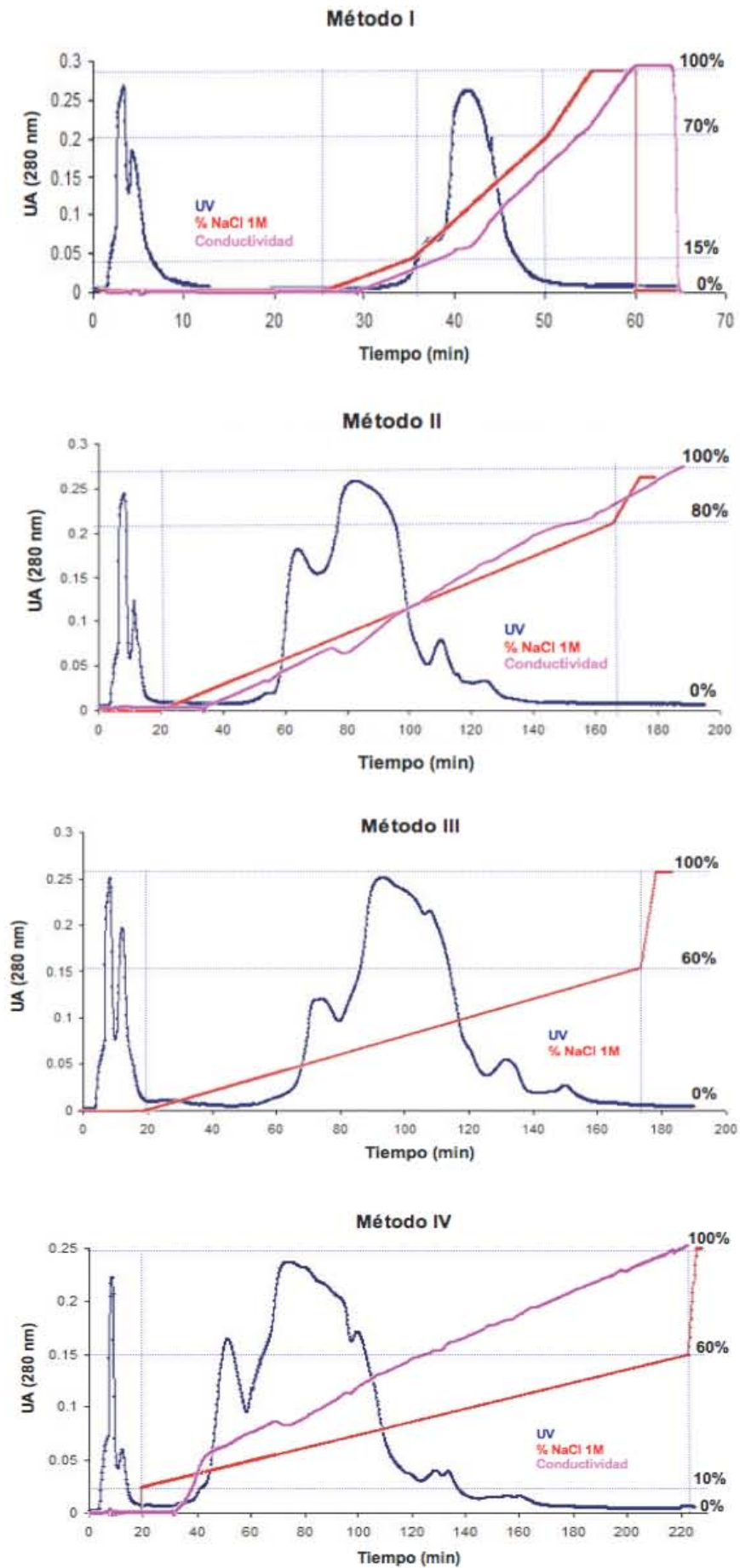


Fig. 6-11. Perfil obtenido de la cromatografía de intercambio aniónico como segundo paso de purificación de LCAT por cuatro métodos distintos (I-IV).

Considerando la abundancia de la banda de 67 kDa y el perfil cromatográfico de la Fig. 6-12a, es factible afirmar que en este paso de purificación fue posible eliminar un alto porcentaje de albúmina, proteína más abundante del plasma con peso molecular de aproximadamente 69 kDa. La presencia de esta banda en el análisis electroforético y del amplio pico en el cromatograma, concuerda con los marcadores de albúmina empleados en ambos análisis. Sin embargo, en este paso se perdió parte considerable de la actividad de LCAT tanto en la FII (con un 47% de la actividad de FIII) como en la FIV (con un 20% de la actividad de la FIII), siendo esta última la más limpia de todas las fracciones.

Una vez identificada la fracción con mayor actividad de LCAT y habiendo eliminado grandes cantidades de albúmina, la FIII_{EX} (FIII del intercambio aniónico) se sometió a una filtración en gel como tercer paso de purificación. La fracción que presentó mayor actividad de LCAT fue la FII (Fig. 6-13c). Aunque en este paso de purificación se eliminó una gran proporción de proteínas de alto peso molecular en la FI, la presencia de varias poblaciones dentro de la FII observadas en el cromatograma de la Fig. 6-13a y la abundancia de bandas (de 67 kDa principalmente) en el gel de la Fig. 6-13b, muestran que aunque enriquecida, la FII aún presenta bastantes proteínas contaminantes.

Aún cuando el ensayo de actividad es la evidencia más contundente de la presencia de la enzima de interés, la gran cantidad de bandas no específicas cercanas al peso molecular de LCAT (67 kDa) nos condujeron a la necesidad de identificarla y comprobar su presencia en fracciones enriquecidas, mediante ensayos de deglicosilación y de inmunodetección tipo Western (Western Blot o WB). En protocolos y pasos previos de purificación no fue posible encontrar las condiciones óptimas para este tipo de monitoreo, debido probablemente a que la gran cantidad de proteínas del plasma enmascararon por completo la pequeña fracción de LCAT presente. La Fig. 6-14a muestra el gel donde se analizaron las muestras tratadas con glicosidasa y la inmunotransferencia de las mismas.

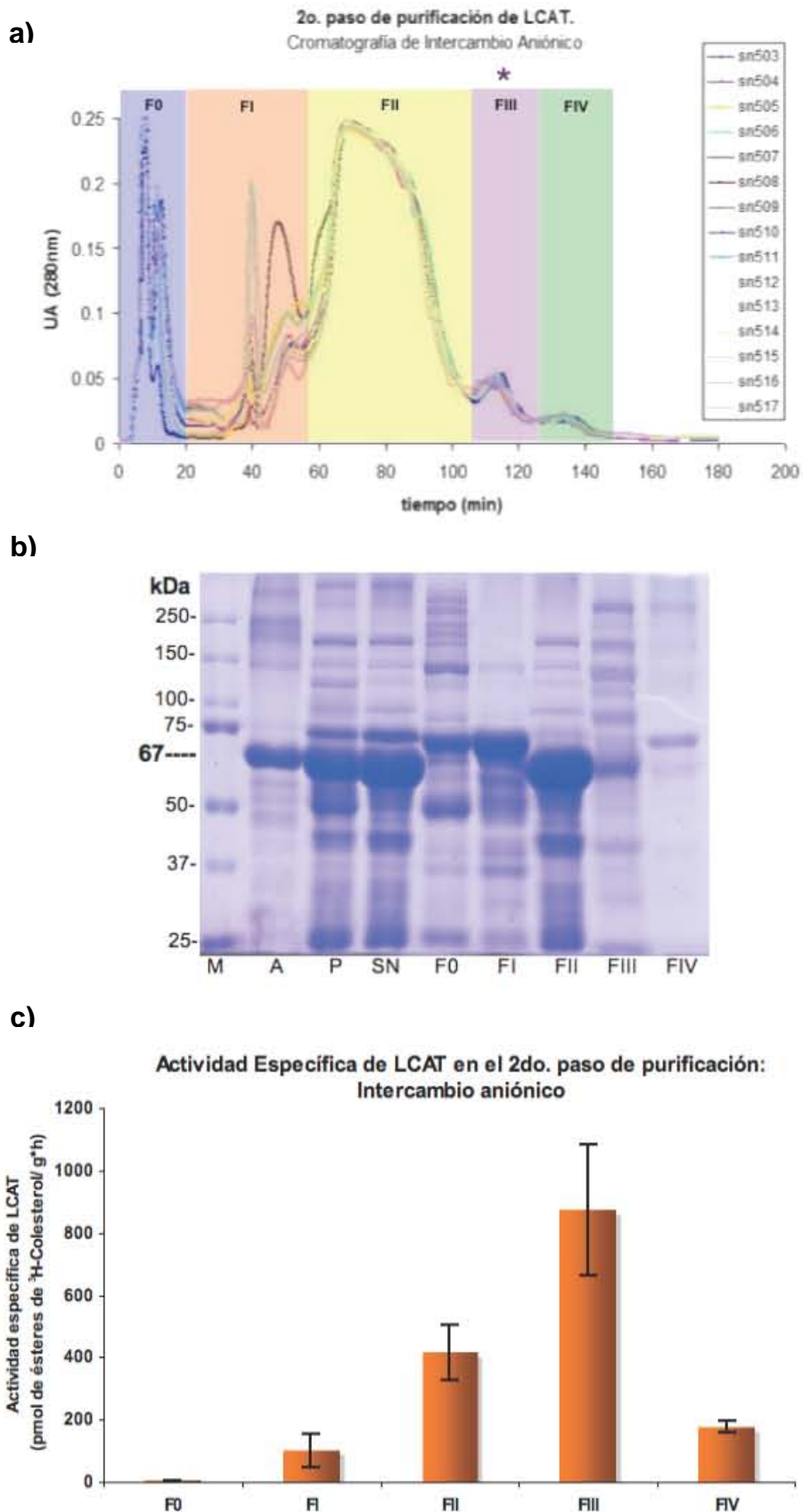
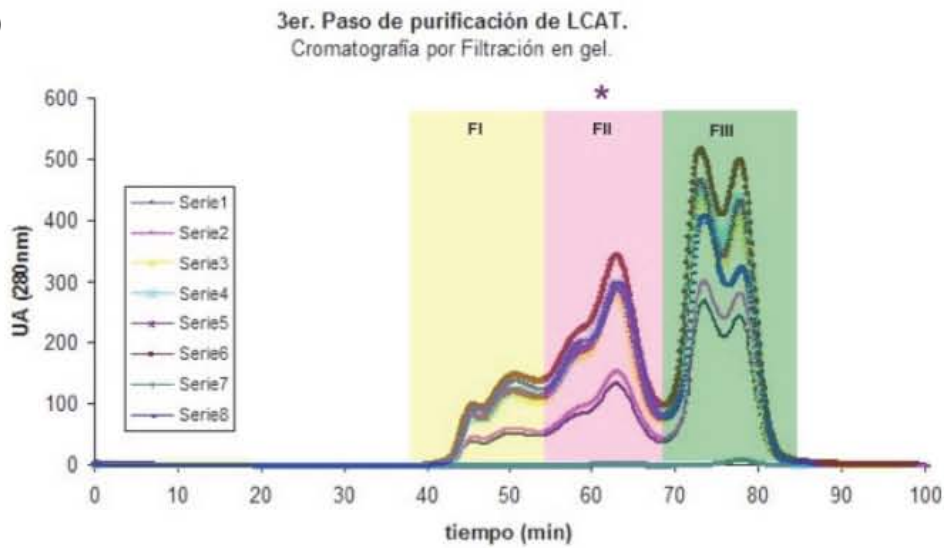
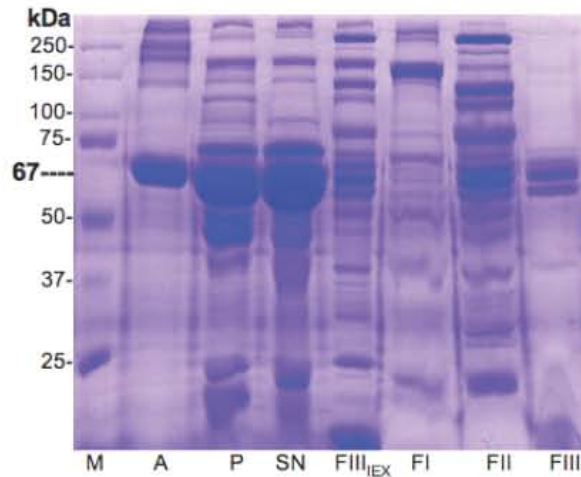


Fig. 6-12. Segundo paso de purificación de LCAT: Cromatografía de intercambio aniónico. a) Cromatogramas que muestran las fracciones F0 a FIV resultantes del intercambio aniónico por el método IV. b) Análisis de dichas fracciones en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie después de un ensayo SDS-PAGE. c) Ensayo de actividad de LCAT. M= marcador (kDa); A= BSA; P= Plasma; SN= sobrenadante; F0 a FIV= fracciones de la cromatografía por intercambio aniónico.

a)



b)



c)

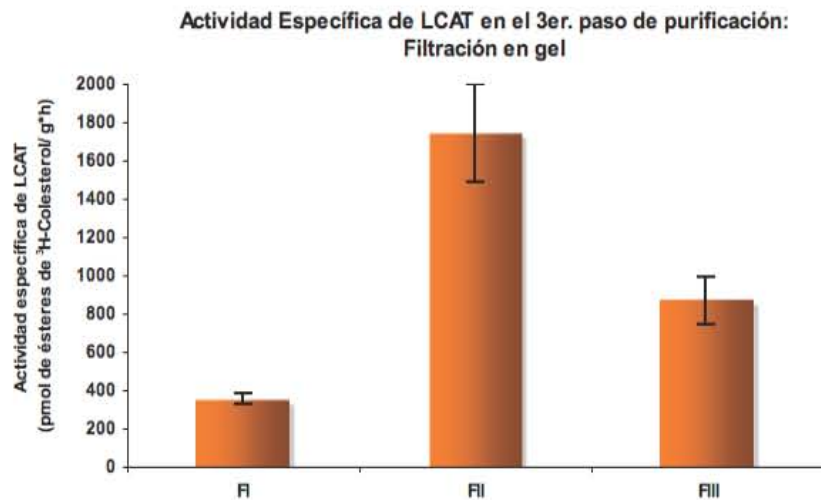


Fig. 6-13. Resumen de todos los pasos de purificación de LCAT incluyendo el tercero de cromatografía de filtración en gel. a) Cromatogramas que muestran las fracciones FI a FIII de la filtración en gel. b) Análisis de dichas fracciones en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie después de un ensayo SDS-PAGE. c) Ensayo de actividad de LCAT. M= marcador (kDa); A= BSA; P= Plasma; SN= sobrenadante; FIII_{EX}= muestra de partida para la filtración en gel; FI a FIII fracciones de la filtración en gel.

En caso de que LCAT correspondiera a alguna de las bandas enriquecidas en 67 kDa, al hacer los ensayos de deglicosilación se esperaba que dichas bandas desaparecieran y que se enriquecieran aquellas cercanas a 48 kDa, peso molecular de la enzima sin glicosilaciones. Tal como se esperaba, en la fracción FI rica en proteínas de alto peso molecular y con mínima actividad de LCAT, no se obtuvo la banda esperada de 48 kDa y prácticamente el peso de la mayoría de las bandas se redujo a 67, 30 y 25 kDa (carril FI-D). En el caso de las fracciones FII y FIII que eran las de mayor interés por presentar ambas la mayor actividad de LCAT, el tratamiento de deglicosilación para el caso de la FII, dio como resultado una ligera disminución de las bandas de 70 y 67 kDa con un incremento de bandas a 60, 55 y 50 kDa, mientras que la deglicosilación de la FIII, mostró una disminución de la banda de 67 kDa para dar lugar a proteínas con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa. En cuanto a la inmunodetección (Fig. 6-14b) esta dio como resultado la presencia de dos bandas intensas en la fracción FII, en la región de los 50 kDa y una banda de aproximadamente 55 kDa para la muestra deglicosilada, lo cual correlaciona bien con la información obtenida del SDS-PAGE, ya que en ambos casos hubo un aumento en la intensidad de bandas específicas a los 50 y 55 kDa. Asimismo, en la Fig. 6-14b, también se puede observar la presencia de LCAT en la FIII, con una ligera señal específica a 50 kDa.

Aún cuando estos resultados en conjunto demostraron de manera contundente que LCAT está enriquecida en la FII, se hizo un experimento final de monitoreo en el que se utilizó el ensayo de inmunoprecipitación (IP) como técnica específica que permite concentrar al máximo la proteína de interés en la muestra disminuyendo considerablemente el número de bandas inespecíficas en la inmunodetección. La Fig. 6-15 muestra la comparación entre la inmunodetección llevada a cabo con proteína total (en el ensayo de WB) y con muestras previamente inmunoprecipitadas. El ensayo de WB muestra nuevamente la presencia de bandas específicas en la región de 50 a 67 kDa de la FII, siendo más intensa la de 55 kDa tal como habían mostrado los ensayos anteriores.

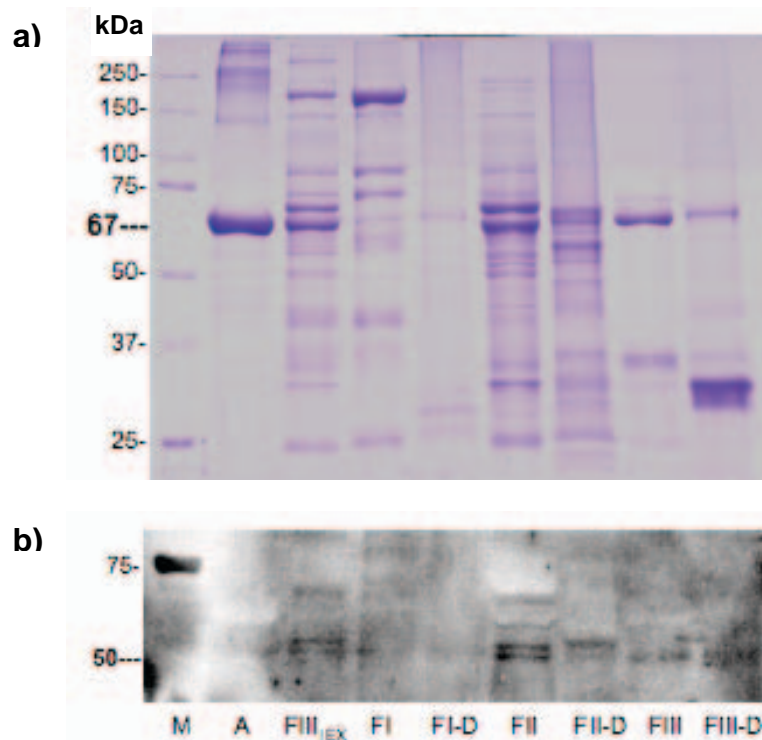


Fig. 6-14. SDS-PAGE y ensayo de inmunodetección de la presencia de LCAT en fracciones enriquecidas por ensayos de cromatografía y deglicosilación. a) Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomasie de las fracciones enriquecidas del tercer paso de purificación con y sin tratamiento de deglicosilación. b) Ensayo de inmunodetección con las fracciones arriba mencionadas. M= marcador (kDa); A= BSA; FIII_{EX}= muestra de partida para hacer la filtración en gel; FI a FIII fracciones de la filtración en gel. FI-D a FIII-D= fracciones de la filtración en gel con tratamiento de deglicosilación.

En cuanto a los resultados de la IP, puede observarse que hay un barrido de bandas en la región de 50 a 67 kDa para FII más intenso que para cualquier otra fracción. Asimismo, en la FIII (una de las fracciones que también presentó actividad de LCAT), se alcanza a apreciar una banda específica a los 55 kDa. Al hacer un análisis con un menor tiempo de exposición de las bandas pertenecientes a la cadena pesada de las inmunoglobulinas en la región de los 50 kDa, se pudo observar claramente la aparición de una banda de aproximadamente 50 kDa (Fig. 6-15b). La fracción FII, presentó una mayor señal en comparación a las otras bandas. En conjunto, estos resultados nos indican que la mayor parte de LCAT obtenida a partir de plasma mediante la estrategia empleada, se encuentra enriquecida en la FII y que contiene mayoritariamente varias de sus isoformas menos glicosiladas con pesos moleculares de entre 50 y 55 kDa aproximadamente.

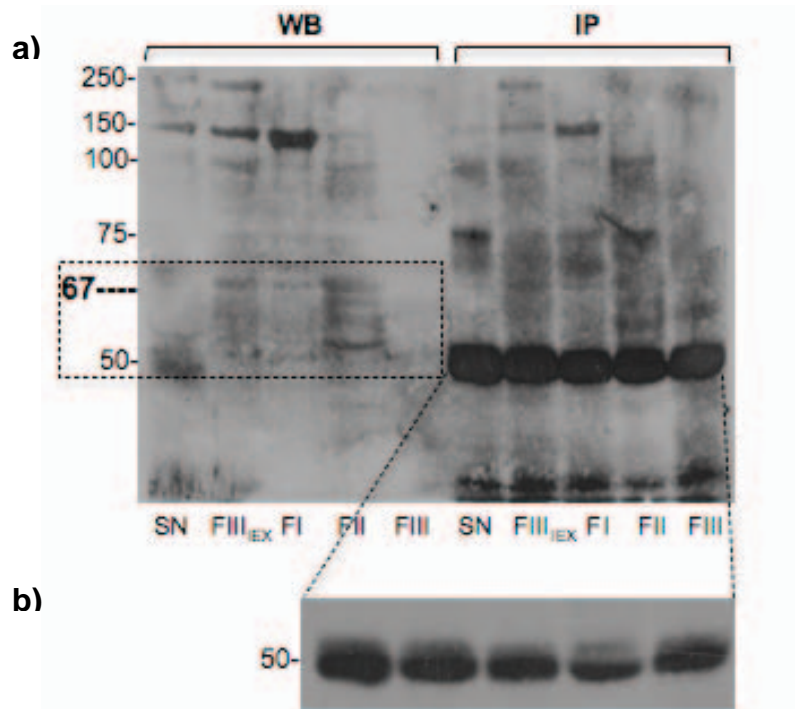


Fig. 6-15. Ensayo de inmunodetección tipo Western de las fracciones procedentes de la cromatografía por filtración en gel. a) Comparación entre las placas obtenidas a partir de proteína total (WB) y de proteína inmunoprecipitada (IP). b) La región maximizada de 50 kDa de las muestras inmunoprecipitadas, muestra una banda que comigra con la señal de a cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Finalmente, la Tabla 6-8 muestra el resumen de los pasos cromatográficos a los que se sometió la muestra de plasma a lo largo del proceso de purificación. Cabe hacer notar que aún cuando el protocolo se inició con 1 L de plasma (sección 5.5), el volumen de muestra que fue sometido a todos los pasos cromatográficos fue de solo 0.5 L y no del litro de partida completo. Debido a esto, en la tabla de purificación se indica un volumen de inicio de aproximadamente 0.5 L de plasma, a partir del cual se realizaron todos los cálculos. De acuerdo con los datos obtenidos, la proteína se enriqueció aproximadamente unas 6 veces con respecto a su concentración normal en plasma, pues de una actividad específica de 309 U por gramo de proteína total, se llegó a casi 1800 U/g. Este valor es muy variable en todos los reportes y depende tanto de la técnica empleada para determinar actividad como del protocolo de purificación que siguieron. En este caso, para recuperar la mayor parte de actividad de la enzima, sería adecuado optimizar y aumentar la

eficiencia de la técnica empleada para determinar la actividad de LCAT y el tipo de amortiguadores utilizados para conservarla estable. Tomando en cuenta que la actividad enzimática fue solamente enriquecida 6 veces en paralelo con un mucho más eficiente enriquecimiento de la banda de LCAT, consideramos que independientemente de haber purificado a la enzima, a lo largo del procedimiento su actividad catalítica fue perdida.

Tabla 6-8. Tabla de purificación de LCAT a partir de plasma humano

Paso	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteína total (g)	Actividad total (U*)	Actividad Específica (U/g)
Plasma completo	486	48	23	7238	309
Sobrenadante de (NH₄)₂SO₄	200	65	13	3805	293
FIII eluída de Q sefarosa XL	34	7.5	0.253	221	874
FII eluída de Superdex 200	5	7.4	0.037	64	1742

* Una unidad se definió como la cantidad de pmol de ésteres de ³H-Colesterol producidos, por h de incubación a 37 °C, pH 7.4, bajo las condiciones citadas en la sección 5.4.

6.3.1. Determinación de la actividad de LCAT en una fracción enriquecida en presencia de los péptidos derivados de Apo AI

Una vez que se obtuvo la fracción enriquecida de LCAT del último paso de purificación de filtración en gel (FII), se procedió a probar el efecto de los péptidos sobre dicha fracción con la finalidad de establecer las condiciones y el tipo de estructuración bajo las cuales estos péptidos eran capaces de activar a la enzima. El primer ensayo se realizó reconstituyendo los péptidos derivados de Apo AI en medio acuoso y utilizando la FII enriquecida como fuente de enzima. Como puede observarse en la Tabla 6-9, después de 3 semanas de haber obtenido la FII ésta ya había perdido poco más del 50% de su actividad original (de 1742 a 948 U/g). Asimismo, al evaluar el efecto de los péptidos DRV, KLL o VLES sobre la recuperación de la actividad de LCAT, se observó que éstos no fueron capaces de activar la reacción ni de tener un efecto importante sobre la misma (Fig. 6-16). Dado que no era posible determinar con certeza si los

péptidos habían perdido su efecto sobre la reacción de LCAT debido a su falta de estructuración o la pérdida de actividad de la FII, se realizó un segundo ensayo reconstituyendo los péptidos en Liso-C₁₂PC para estructurarlos en hélice α y evaluar si en esa conformación eran capaces de recuperar la actividad de la enzima. Los resultados muestran que a las 5 semanas de haber obtenido la FII, ésta ya había perdido su actividad de LCAT casi por completo (en un 86%, de 1742 a 250 U/g) y que bajo esas condiciones, ni el lisofosfolípido usado como control, ni los péptidos estructurados en hélice α , tuvieron un efecto significativo sobre la actividad de LCAT (Tabla 6-9 y Fig. 6-16).

Con estos resultados podemos demostrar que LCAT es una enzima muy lábil, cuya estructura y consecuente función es altamente dependiente de su medio de reacción. En cuanto al efecto de los péptidos sobre la activación de LCAT, los resultados sugieren que éstos son totalmente dependientes de que la enzima se encuentre en una óptima conformación y en un nivel adecuado de actividad para que éstos puedan actuar. Por otro lado, sería conveniente optimizar las condiciones de almacenamiento de las fracciones enriquecidas para poder mantenerla estable por más tiempo y así poder hacer un mayor número de experimentos en presencia de los péptidos bajo distintas condiciones. Con lo que respecta a la purificación de LCAT, para concluir este proceso sería necesario someter la última fracción obtenida a posteriores pasos tales como una cromatografía con hidroxapatita o de afinidad a concanavalina para eliminar el resto de las proteínas contaminantes y enriquecer aún más dicha fracción. La obtención de esta fracción altamente enriquecida y más estable nos permitiría realizar experimentos con los péptidos derivados de Apo AI en diferentes conformaciones, en un sistema más controlado y con cantidades mayores de enzima. Ensayos de este tipo nos permitirían atribuir con toda certeza el efecto directo de los péptidos sobre la actividad de la enzima, completar los ensayos de cinética enzimática para obtener los parámetros de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m y proponer un posible mecanismo de activación de éstos sobre LCAT correlacionado con los cambios estructurales específicos de tipo desorden-orden que estos segmentos sufren dentro del sistema del transporte de lípidos en plasma.

Tabla 6-9. Actividad de LCAT en la fracción enriquecida FII en presencia de los péptidos derivados de Apo AI reconstituidos en distintos medios.

Muestra	Actividad Específica de LCAT (pmol de ésteres de ³ H-Colesterol/g*h)	
	Péptidos en medio acuoso (3 semanas después de obtenida la fracción)	Péptidos en Liso-C ₁₂ PC (5 semanas después de obtenida la fracción)
	Plasma	488
FII	948	250
FII + Liso 30 mM	----	245
FII + DRV	819	280
FII + KLL	908	237
FII + VLES	889	216

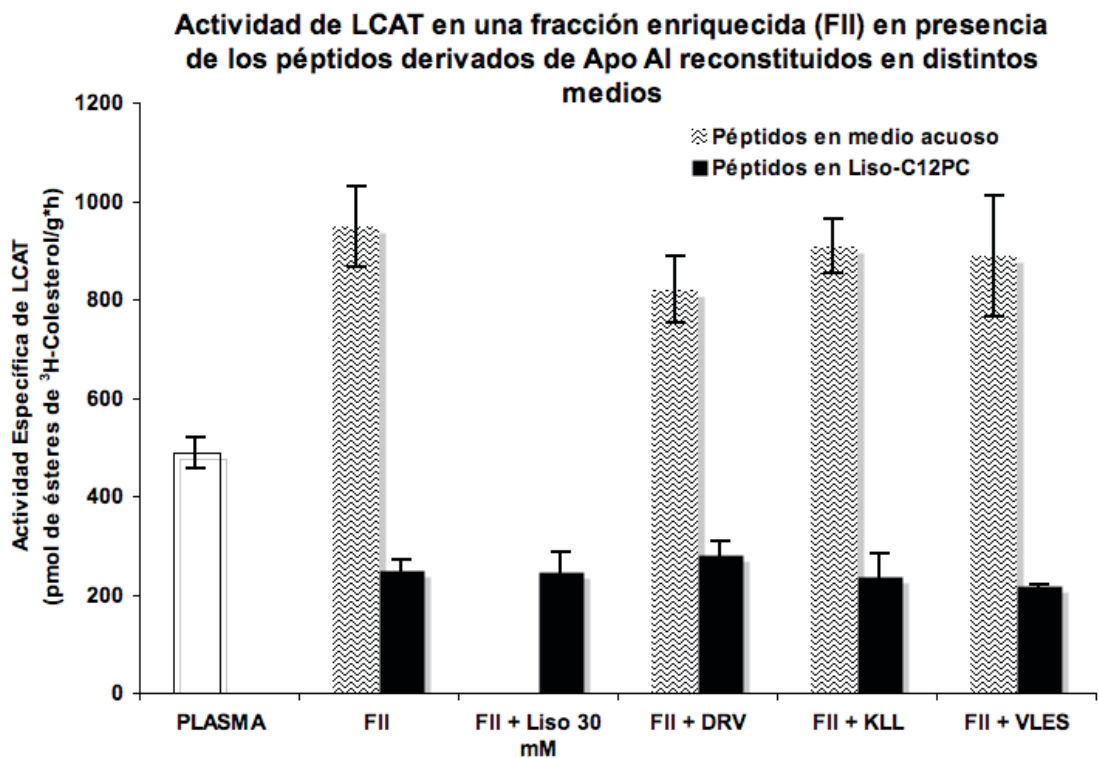


Fig. 6-16. Actividad de LCAT en una fracción enriquecida (FII) en presencia de los péptidos derivados de Apo AI reconstituidos en distintos medios. Las barras con ondas representan los ensayos de actividad de LCAT con los péptidos reconstituidos en medio acuoso (desordenados), llevados a cabo a las 3 semanas de obtenida FII. Las barras oscuras representan los ensayos con los péptidos reconstituidos en Liso-C₁₂PC (estructurados en α) llevados a cabo a las 5 semanas de obtenida la FII.

VII. Conclusiones

- Los péptidos DRV, KLL y VLES derivados de la Apo AI presentan altos contenidos de estructuras β y al azar en medio acuoso (PBS pH 7.4) y aumentan su tendencia a desordenarse conforme la concentración del péptido aumenta.
- Los péptidos reconstituidos en medio acuoso, tienen un efecto activador diferencial sobre la reacción de LCAT en plasma, dependiente de su secuencia y concentración: KLL y VLES fueron más eficaces a 0.3 mg/mL, mientras que DRV lo fue a 0.6 mg/mL.
- Una concentración de Liso- C_{12} PC 30 mM es óptima para mantener los tres péptidos estructurados en hélice α a diferentes concentraciones sin abatir la reacción de LCAT. Mayores concentraciones de fosfolípido la inhiben por completo.
- Los péptidos estructurados en hélice α , son capaces de activar la reacción de LCAT en plasma con una tendencia similar a la que presentaron en medio acuoso: VLES a 0.3 mg/mL y DRV a 0.6 mg/mL fueron los péptidos que mostraron un mayor aumento en la actividad de la reacción de LCAT.
- Los péptidos inicialmente desordenados son capaces de incrementar la eficiencia de la reacción de LCAT, tal como lo hacen estructurados en hélice α . Este es un indicio indirecto de que los péptidos presentan transiciones desorden-orden una vez que forman parte del sistema de ensayo.
- La purificación de LCAT a partir de plasma humano es un proceso complejo que consta de múltiples pasos de purificación y requiere el uso de diversas técnicas de monitoreo de la presencia de la proteína y de la conservación de su actividad a lo largo del proceso de aislamiento. Los bajos rendimientos son debidos a la inestabilidad que la enzima presenta en fracciones enriquecidas.

VIII. Perspectivas

- Determinar la actividad de LCAT en presencia de los péptidos DRV, KLL y VLES en diferentes conformaciones, utilizando tanto el sistema de ensayo con plasma inactivado por calor, como un sistema micelar diseñado con diversas proporciones de lípidos.
- Determinar la actividad de LCAT en presencia del péptido denominado LRTH (aminoácidos 159-180) perteneciente a una región central de la Apo AI y considerado como sitio de unión a LCAT.
- Probar el efecto de péptidos derivados de otras apolipoproteínas humanas tales como Apo CI y Apo AII, sobre la actividad de LCAT.
- Hacer una correlación estructura-actividad con base en los efectos de activación (o inhibición) de la reacción de LCAT por efecto de péptidos derivados de diferentes apolipoproteínas humanas.
- Evaluar la importancia de las transiciones desorden-orden que experimentan los péptidos derivados de Apos humanas en función del medio externo que “sensan” y proponer un posible mecanismo de acción de este tipo de segmentos como interruptores moleculares del proceso de activación de LCAT.
- Concluir el proceso de purificación, sometiendo la fracción enriquecida a una cromatografía con hidroxapatita o de afinidad a concanavalina.
- Realizar ensayos de actividad con LCAT purificada en un sistema con composición lípido:proteína finamente controlado.

IX. Referencias

- Adimoolam, S y Jonas, A. Identification of a domain of lecithin-cholesterol acyltransferase that is involved in interfacial recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *232*, 783-787.
- Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M. y Murthy, M. K. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: Insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 2126-2131.
- Albers, J. J., Chen, C-H. y Lacko, A. G. Isolation, characterization, and assay of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. *Methods in enzymology* **1986**, *129*, 763-783.
- Bolaños-García, V. M., Ramos, S., Castillo, R., Xicohtencatl-Cortes, J. y Mas-Oliva, J. Monolayers of apolipoproteins at the air/water interface. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 5757-5765.
- Bolaños-García, V. M., Mas-Oliva, J., Ramos, S. y Castillo, R. Phase transitions in monolayers of human apolipoprotein C-I. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 6236–6242.
- Bonelli, F. S. y Jonas, A. Reaction of lecithin cholesterol acyltransferase with water-soluble substrates. *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 14723-14728.
- Brewer, H. B., Fairwell, T, LaRue, A., Ronan, R., Houser, A. y Bronzert, T. J. The amino acid sequence of human ApoA-I, an apolipoprotein from high density lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1978**, *80*, 623-630.
- Brouillette, C. G., Anantharamaiah, G. M., Engler, J. A. y Borran, D. W. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochimica et Biophysica Acta* **2001**, *1531*, 4-46.
- Chong, K. S., Hara, S., Thompson, R. E. y Lacko, A. G. Characterization of lecithin: cholesterol acyltransferase from human plasma: II. Physical Properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1983**, *222*, 553-560.

- Chung, J., Abano, D. A. Fless, G. M. y Scanu, A. M. Isolation, properties and mechanism of *in vitro* action of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma. *The Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254*, 7456-7464.
- Dalmas, B., Hunter, G. J. y Bannister, W. H. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra using artificial neural network techniques. *Biochemistry and Molecular Biology International* **1994**, *34*, 17-26.
- Doi, Y. y Nishida, T. Lecithin cholesterol acyltransferase from human plasma. *Methods in enzymology* **1981**, *71*, 753-767.
- Doi, Y. y Nishida, T. Microheterogeneity and physical properties of human lecithin:cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 5840-5846.
- Eckardstein, A. V. Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes. *Atherosclerosis* **2006**, *186*, 231-239.
- Eisenberg D., *et al.* Prediction of Protein structure and the principles of protein conformation: Hydrophobic moments as tools for analyzing protein sequences and structures. Ed. New York, N.Y., Plenum Press **1989**.
- Eisenberg, D., Weiss, R. M. y Terwilliger, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* **1982**, *299*, 371-374.
- Fielding, C. J. y Collet, X. Phospholipase activity of Lecithin-cholesterol acyltransferase. *Methods in enzymology* **1991**, *197*, 426-433.
- Fielding, C. J. y Fielding, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research* **1995**, *36*, 211-228.
- Fielding, C. J., Shore, V. G. y Fielding, P. E. A protein cofactor of Lecithin:Cholesterol Acyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1972**, *46*, 1493-1498.
- German, J. B., Smilowitz, J. T. y Zivkovic, A. M. Lipoproteins: When size really matters. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2006**, *11*, 171-183.
- Glomset, J. A. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *Journal of Lipid Research* **1968**, *9*, 155-167.
- Glomset, J. Plasma cholesterol esterifying enzyme. *Methods of Enzymology* **1969**, *15*, 543-548.

- Glomset, J. y Wright, J. Some properties of a cholesterol esteryfying enzyme in human plasma. *Biochimica et Biophysica acta* **1964**, 89, 266-276.
- Guerin, M., Dolphin, P. J. y Chapman, M. J. A new in vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies. Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **1994**, 14, 199-206.
- Gurr, M. I. y Harwood, J. L. *Lipid Biochemistry: An introduction*. Chapman & Hall. 4ta. Ed. **1991**, 198-213.
- Holmquist, L. Selective extraction of lecithin:cholesterol acyltransferase (EC 2.3.1.43) from human plasma. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2002**, 52, 63-68.
- Holmquist, L. y Bjellqvist, B. Microheterogeneity of human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase examined by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **1988**, 9, 580-582.
- Jauhiainen, M. y Dolphin, P. J. Human plasma lecithin:cholesterol aciltransferase (LCAT). On the role of essential carboxyl groups in catalysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1990**, 285, 71-75.
- Johnson, W. C., Jr. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **1999**, 35 (3), 307-312.
- Jonas, A. Lecithin colesterol acyltransferase, review. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, 1529, 245-256.
- Jonas, A. Lecithin-Cholesterol Acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins, review. *Biochimica et Biophysica Acta* **1991**, 1084, 205-220.
- Jonas, A. Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *Progress in Lipid Research* **1998**, 37, 209-234.
- Jonas, A., Kezdy, K. E. Williams, M. I. y Rye, K. A. Lipid transfers between reconstituted high density lipoprotein complexes and low density lipoproteins: effects of plasma protein factors. *Journal of Lipid Research* **1988**, 29, 1349-1357.

- Jones, M. K., Anantharamaiah, G. M. y Segrest, J. P. Computer programs to identify and classify amphipathic α helical domains. *Journal of Lipid Research* **1992**, 33, 287.
- Klon, A. E., Segrest, J. P. y Harvey, S. C. Comparative models for human apolipoprotein A-I bound to lipid in discoidal high-density lipoprotein particles. *Biochemistry* **2002**, 41, 10895-10905.
- Kosek, A. B., Durbin, D y Jonas, A. Binding affinity and reactivity of lecithin cholesterol acyltransferase with native lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 258, 548-551.
- Labeur, C., Lins, L., Vanloo, B, Baert, J., Brasseur, R. y Rosseneu, M. Design of a new class of amphipathic helical peptides for the plasma apolipoproteins that promote cellular cholesterol efflux but do not activate LCAT. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **1997**, 17, 580-588.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- Lewis, G. F. Y Rader, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research* **2005**, 96, 1221-1232.
- Lima, V. L. M., Coelho, L. C. B. B., Kennedy, J. F., Owen, J. S. Y Dolphin, P. J. Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) as a plasma glycoprotein: an overview. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 55, 179-191.
- Lima, V. L. M., Harry, D. S., McIntyre, N., Owen, J. S. y Chaves, M. E. C. Characterization and potential uses of rabbit polyclonal antibodies against human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **1996**, 29, 957-968.
- Liu, M y Subbaiah, V. Activation of plasma lysolecithin acyltransferase reaction by apolipoproteins A-I, C-I and E. *Biochimica et Biophysica Acta* **1993**, 1168, 144-152.
- Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **2000**, 407, 233-241.
- Matz, C. E. y Jonas, A. Reaction of human lecithin cholesterol acyltransferase with synthetic micellar complexes of apolipoprotein AI, phosphatidylcholine, and cholesterol. *The journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 4541-4546.

- McLean, J. Fielding, C, Drayna, D., Dieplinger, H, Baer, B., Kohr, W., Henzel, W. y Lawn, R. Cloning and expression of human lecithin:cholesterol acyltransferase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1986**, 83, 2335-2339.
- Mendoza-Espinosa, P., Moreno, A., Castillo, R. y Mas-Oliva, J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, 365, 8–15.
- Montserret, R., McLeish, M. J., Böckmann, A., Geourjon, C. y Penin, F. Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium docecil sulfatate binding. *Biochemistry* **2000**, 39, 8362-8373.
- O, K., Hill, J. S., Wang, X., McLeod, R. y Pritchard, P. H. Lecithin: cholesterol acyltransferase: role of N-linked glycosylation in enzyme function. *Biochemical Journal* **1993**, 294, 879-884.
- Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q. y Chen, C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Quaterly Journal of Medicine* **2005**, 98, 845-856.
- Owens, R. J., Anantharamaiah, G. M., Kahion, J. B., Srinivas, R. V., Compans, R. W. y Segrest, J. P. Apolipoprotein A-I and its amphipathic helix peptide analogues inhibit human immunodeficiency virus-induced syncytium formation. *The Journal of Clinical Investigation* **1990**, 86, 1142-1150.
- Palgunachari, M. N., Mishra, V. K., Lund-Katz, S, Phillips, M. C., Adeyeye, S. O., Alluri, S., Anantharamaiah, G. M. y Segrest, J. P. Only the two end helixes of eight tandem amphipathic helical domains of human apo-AI have significant lipid affinity-implications for HDL assembly. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **1996**, 16, 328-338.
- Peelman, F., Vinaimont, A., Verhee, A., Vanloo, B., Verschelde, J-L., Labeur, C., Seguret-Mace, S., Duverger, N., Hutchinson, G., Vandekerckhove, J., Tavernier, J. y Rosseneu, M. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT): Identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Science* **1998**, 7, 587-599.

- Pieper, U., Eswar, N., Braberg, H., Madhusudhan, M. S., Davis, F. P., Stuart, A. C., Mirkovic, N., Rossi, A., Marti-Renom, M. A., Fiser, A., Webb, B., Greenblatt, D., Huang, C. C., Ferrin, T. E. y Sali, A. MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 217-222.
- Piran, U. y Morin, R. J. A rapid radioassay procedure for plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Journal of Lipid Research* **1979**, *20*, 1040-1043.
- Provencher, S. W. y Glöckner, J. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **1981**, *20*, 33-37.
- Ranjbar, B y Gill, P. Circular Dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses - A review. *Chemical Biology and Drug Design* **2009**, *74*, 101-120.
- Receveur-Bréchet, V., Bourhis, J. M., Uversky, V. N., Canard, B. y Longui, S. Assessing protein disorder and induced folding. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **2006**, *62*, 24-45.
- Salonen, J. T., Salonen, R., Seppanen, K., Rauramaa, R. y Tuomilehto, J. HDL, HDL2, Y HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation* **1991**, *84*, 129-139.
- Scanu, A. M. y Edelstein, C. HDL: bridging past and present with a look at the future. *The FASEB Journal* **2008**, *22*, 4044-4054.
- Schiffer, M. y Edmundson, A. B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophysical Journal* **1967**, *7*, 121-135.
- Schindler, P. A., Settineri, C. A., Collet, X., Fielding, C. J. y Burlingame, A. L. Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin: cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein Science* **1995**, *4*, 791-803.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H., Brouillette, C. G., Venkatachalapathi, Y. V. y Anantharamaiah, G. M. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *Journal of Lipid Research* **1992**, *33*, 141-166.

- Silva, R. A. G. D., Huang, R., Morris, J., Fang, J., Gracheva, E. O., Ren, G., Kontush, A., Jerome, W. G., Rye, K. A. y Davidson, W. S. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 12176-12181.
- Smith, N. B. y Kuksis, A. Stereochemical substrate requirements of lecithin:cholesterol acyltransferase and its inhibition by enantiomeric lysolecithins. *Canadian Journal of Biochemistry* **1980**, *58*, 1286-1291.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **1985**, *150*, 76-85.
- Sparks, D. L., Frank, P. G. y Neville, T. A-M. Effect of the surface lipid composition of reconstituted LPA-I on apolipoprotein A-I structure and lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1390*, 160-172.
- Stafford, R. E. y Dennis, E. A. Lysophospholipids as biosurfactants. *Colloids and surfaces* **1988**, *30*, 47-64.
- Sorci-Thomas, M. G. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices. *Clinical Lipidology* **2009**, *4*, 113-124.
- Sreerama, N. y Woody, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochemistry* **1993**, *209*, 32-44.
- Sreerama, N. y Woody, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparision of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* **2000**, *287*, 252-260.
- Subbaiah, P. V. Lysolecithin acyltransferase of human plasma: assay and characterization of enzyme activity. *Methods in enzymology* **1986**, *129*, 790- 797.
- Varma, K. y Soloff, L. A method for the purification of milligram quantities of stable human phosphatidylcholine-cholesterol acyltransferase. *Biochemical Journal* **1976**, *155*, 583-588.

- Wang, M y Briggs, M. R. HDL: The metabolism, function, and therapeutic importance. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 119-137.
- Whitmore, L y Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, **2007**, *89* (5), 392-400.
- Wu, Z., Wagner, M. A., Zheng, L., Parks, J. S., Shy-III, J. M., Smith, J. D., Gogonea, V. y Hazen, S. L. The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nature structural & molecular biology* **2007**, *14*, 861-868.
- Xicotencatl-Cortes, J., Castillo, R. y Mas-Oliva, J. In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *324*, 467-470.
- Zannis, V. I., Chroni, A. y Krieger, M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, y SR-BI in the biogenesis of HDL. *Journal of Molecular Medicine* **2006**, *84*, 276-294.

X. Apéndices

10.1. Apéndice 1. Resumen de las propiedades de la Apolipoproteína AI en diferentes niveles de organización

Nivel de organización	Propiedad de Apo AI	
Estructura primaria (Apo AI madura)	Número de aminoácidos y cadenas	243 aminoácidos en 1 cadena polipeptídica
	Peso molecular	28 kDa
	Glicosilaciones o puentes disulfuro	Ninguna
	Contenido de hélice α	50-57%
Estructura secundaria	Repeticiones	11meros y 22meros
	Actividad en la superficie	ALTA, en interfases aire-agua, sólido-agua y lípido-agua
	Simetría	Asimétrica y flexible en solución acuosa
Estructura terciaria	Cristal de 2.4 Å de resolución (Ajees <i>et al</i> , 2006)	4 hélices antiparalelas en el amino terminal y 2 hélices en el carboxilo terminal
Estructura cuaternaria	Autoasociación	Monómeros, dímeros, tetrameros, octámeros
En partículas discoidales	Composición	150 moléculas PC + 2 de Apo AI; 96 Å de diámetro
	Modelos propuestos	<ul style="list-style-type: none"> • Modelo de valla • Modelo de doble cinturón • Modelo de pasador
	Composición	Núcleo de TGs y ésteres de colesterol. Monocapa de PLs y colesterol libre + 3 moléculas de Apo; 93 Å de diámetro
En partículas esféricas	Modelos propuestos	<ul style="list-style-type: none"> • Modelo doble cinturón+pasador • Triple cinturón • Trébol
	Métodos de reconstitución	<ul style="list-style-type: none"> • Incubación con LCAT y LDL • Co-sonicación de mezclas de Apo AI y lípidos • Diálisis con colato

Modificada de Scanu y Edelstein, 2008.

10.2. Apéndice 2. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI disueltos en PBS pH 7.4 determinado con el programa CDPro* en dos diferentes intervalos de longitud de onda

2

$\lambda = 260-200 \text{ nm}$				$\lambda = 260-190 \text{ nm}$				Concentración
VLES	KLL	DRV	Péptido Programa	VLES	KLL	DRV	Péptido Programa	
1.0	-----	11.2	Selcon3	-----	17.9	11.4	Selcon3	% α
5.5	5.7	6.5	Continll	6.4	6.7	8.6	Continll	
2.2	1.4	29.0	CDctr	3.1	3.6	7.4	CDctr	
4.2	-----	30.8	Selcon3	-----	34.8	32.2	Selcon3	% β
37.3	37.7	33.1	Continll	36.3	36.9	3.1	Continll	
38.7	37.7	36.0	CDctr	35.1	38.2	38.6	CDctr	
48.9	-----	32.8	Selcon3	-----	13.5	30.5	Selcon3	% azar
34.0	34.5	36.7	Continll	33.9	33.2	35.6	Continll	
32.5	34.1	36.2	CDctr	35.1	33.0	28.7	CDctr	
0.0	23.8	12.2	Selcon3	13.2	21.3	-----	Selcon3	% α
7.4	14.3	19.9	Continll	7.1	14.7	17.8	Continll	
6.7	7.0	21.1	CDctr	4.5	5.8	1.9	CDctr	
10.2	51.6	73.0	Selcon3	27.3	28.3	-----	Selcon3	% β
37.9	34.0	29.4	Continll	40.1	32.7	31.5	Continll	
41.7	37.9	33.3	CDctr	36.1	38.7	28.9	CDctr	
60.7	14.3	1.8	Selcon3	24.1	18.1	-----	Selcon3	% azar
32.5	30.4	25.7	Continll	30.9	28.8	26.2	Continll	
26.0	31.1	25.5	CDctr	35.5	32.3	28.7	CDctr	
5.7	3.3	16.9	Selcon3	19.5	14.4	15.4	Selcon3	% α
7.9	4.2	20.5	Continll	6.0	4.1	20.5	Continll	
8.0	2.6	16.6	CDctr	5.5	1.0	6.6	CDctr	
34.1	31.0	13.8	Selcon3	37.0	44.2	36.0	Selcon3	% β
39.8	38.9	22.4	Continll	40.3	40.7	23.9	Continll	
44.6	36.6	26.1	CDctr	38.1	34.6	38.4	CDctr	
49.3	42.5	46.8	Selcon3	19.6	15.8	24.6	Selcon3	% azar
31.2	34.8	36.6	Continll	31.4	33.3	32.8	Continll	
24.4	35.7	32.8	CDctr	33.3	34.3	33.0	CDctr	

*CDPro incluye los programas Selcon3, Continll y CDctr.

10.3. Apéndice 3. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo AI reconstituidos en diferentes concentraciones de Liso-C₁₂PC, determinado con el programa CPro* en dos diferentes intervalos de longitud de onda

$\lambda = 260- 200 \text{ nm}$				$\lambda = 260-190 \text{ nm}$				Concentración	% Estructura 2ria
VLES	KLL	DRV	Péptido Programa	VLES	KLL	DRV	Péptido Programa		
29.1	41.4	41.8	Selcon3	30.6	44.9	43.1	Selcon3	0.3 mg/mL / Liso-C ₁₂ PC 30 mM	
39.2	43.1	42.8	Continll	38.3	42.9	44.1	Continll		
42.2	48.3	45.7	CDcctr	43.7	48.8	46.5	CDcctr		
17.0	12.3	11.0	Selcon3	23.4	3.8	7	Selcon3	% β	
11.6	14.9	12.3	Continll	12.8	10.9	14.2	Continll		
13.6	12.5	10.8	CDcctr	13.9	10.5	9	CDcctr		
28.5	26.3	27.7	Selcon3	24.4	28.6	27.6	Selcon3	% azar	
30.7	25.2	27.5	Continll	28.6	22.9	20.8	Continll		
27.3	21.5	26.3	CDcctr	28.8	22.0	25.8	CDcctr		
26.9	34.4	42.7	Selcon3	19.6	23.7	39.0	Selcon3	0.6 mg/mL / Liso-C ₁₂ PC 60 mM	
33.0	34.3	44.0	Continll	36.2	35.4	45.0	Continll		
25.3	37.4	45.7	CDcctr	19.9	38.4	44.7	CDcctr		
18.0	16.4	11.9	Selcon3	25.3	23.6	10.9	Selcon3	% β	
11.5	15.3	8.7	Continll	7.8	11.2	5.6	Continll		
23.1	16.8	10.1	CDcctr	27.5	14.8	11.3	CDcctr		
31.3	29.9	29.8	Selcon3	32.4	31.5	30.7	Selcon3	% azar	
37.2	29.7	32.4	Continll	36.7	31.9	30.3	Continll		
30.4	27.5	27.1	CDcctr	30.1	28.8	26.5	CDcctr		
16.9	16.6	37.8	Selcon3	11.1	15.3	24.6	Selcon3	0.9 mg/mL / Liso-C ₁₂ PC 30 mM	
8.9	5.8	36.5	Continll	10.8	5.1	39.9	Continll		
4.4	3.3	41.4	CDcctr	4.6	4.3	24.8	CDcctr		
35.3	33.8	15.7	Selcon3	40.2	33.6	22.2	Selcon3	% β	
12.6	39.4	11.4	Continll	32.7	39.2	6.1	Continll		
33.5	36.3	20.1	CDcctr	34.8	37.0	29.9	CDcctr		
26.3	24.1	28.5	Selcon3	28.0	29.5	33.0	Selcon3	% azar	
48.0	33.2	35.0	Continll	35.9	33.5	35.3	Continll		
31.6	26.0	24.4	CDcctr	33.4	30.4	25.0	CDcctr		

*CPro incluye los programas Selcon3, Continll y CDcctr.

10.4. Apéndice 4. Contenido de estructura secundaria de los péptidos derivados de Apo A1 reconstituidos en Liso-C₁₂PC 30 mM determinado con el programa CDPPro* en dos diferentes intervalos de longitud de onda

$\lambda = 260-200 \text{ nm}$				$\lambda = 260-190 \text{ nm}$				Concentración
VLES	KLL	DRV	Péptido / Programa	VLES	KLL	DRV	Péptido / Programa	
43.6	14.3	44.2	Selcon3	42.2	18.0	32.7	Selcon3	% α
45.1	22.0	22.0	Continll	41.9	30.5	22.4	Continll	
45.2	20.2	41.0	CDcctr	48.1	22.0	41.0	CDcctr	
10.0	29.8	14.1	Selcon3	8.5	37.1	19.0	Selcon3	% β
9.1	28.0	31.9	Continll	11.8	15.6	27.1	Continll	
10.8	25.6	22.6	CDcctr	9.9	26.2	19.8	CDcctr	
28.2	30.7	25.0	Selcon3	30.5	28.6	28.0	Selcon3	% azar
28.7	28.0	27.1	Continll	26.8	30.1	28.0	Continll	
26.1	25.6	23.1	CDcctr	22.9	28.0	22.9	CDcctr	
37.0	30.7	36.1	Selcon3	32.7	13.0	25.7	Selcon3	% α
39.6	28.0	22.4	Continll	39.9	20.4	20.0	Continll	
39.4	32.2	40.1	CDcctr	39.8	19.7	20.8	CDcctr	
13.9	14.3	19.8	Selcon3	13.2	29.8	25.0	Selcon3	% β
7.5	22.2	25.4	Continll	4.8	27.4	25.7	Continll	
13.5	20.7	20.6	CDcctr	14.1	26.0	37.3	CDcctr	
31.3	29.6	28.5	Selcon3	35.2	31.5	30.2	Selcon3	% azar
36.0	26.7	34.9	Continll	36.1	29.9	33.5	Continll	
30.4	26.1	26.3	CDcctr	29.7	30.6	25.0	CDcctr	
—	30.5	—	Selcon3	20.2	9.3	—	Selcon3	% α
32.8	28.5	16.7	Continll	34.4	18.6	6.8	Continll	
23.2	31.1	6.1	CDcctr	19.9	15.9	3.2	CDcctr	
—	10.3	—	Selcon3	25.1	33.3	—	Selcon3	% β
9.7	18.5	22.2	Continll	7.4	28.7	48.8	Continll	
23.6	17.5	49.0	CDcctr	28.6	29.0	47.4	CDcctr	
—	34.2	—	Selcon3	33.8	34.2	—	Selcon3	% azar
37.6	29.5	37.4	Continll	38.8	29.9	28.9	Continll	
32.2	29.1	24.1	CDcctr	28.2	30.7	22.5	CDcctr	

*CDPro incluye los programas Selcon3, Continll y CDcctr.

10.5. Apéndice 5. Resultados de los diversos protocolos probados para aislar LCAT a partir de plasma humano

Protocolo 1.

El primer paso de purificación se basó en el reporte de Holmquist (2002) que propone la extracción de LCAT de plasma humano en un solo paso por intercambio aniónico con Q-Sefarosa a pH 5 y baja fuerza iónica. Este método propone que LCAT se adsorbe reversible y cuantitativamente a dicha matriz eliminando cerca del 90 % de las proteínas plasmáticas y todas las lipoproteínas. Para separar LCAT de la albúmina de suero humano (HSA, proteína más abundante en plasma), el principal criterio tomado en cuenta en este reporte fue la diferencia entre el pI de LCAT (pI= 4.8) y el de la HSA (pI= 5.2). El protocolo se llevó bajo las condiciones descritas solo que usando la matriz en suspensión (batch). Para eluir la proteína unida específicamente a la matriz se aplicó un gradiente salino a partir de la fracción 13. Los valores de absorbancia fueron graficados para obtener el perfil de elución de las proteínas presentes en el plasma acidificado (Fig. 10-1a). El ensayo analítico que se utilizó para monitorear la presencia de LCAT fue la separación por SDS-PAGE. Un aumento en la banda de 69 kDa correspondiente a LCAT, sería indicativo de la presencia y enriquecimiento de ésta. En este ensayo se observó que las fracciones eluidas con el gradiente salino, presentaron una clara disminución de la banda de 67 kDa (correspondiente a la HSA) (Fig. 10-1b). Las bandas minoritarias de 69 kDa eluidas con 0.3 M de NaCl (fracción 15) se asociaron a la probable presencia de LCAT.

Dado que no fue posible separar ninguna de las proteínas en un solo paso de purificación, la fracción 15 fue sometida a una cromatografía en columna por filtración en gel Superdex 200 para eliminar las bandas contaminantes. Con este segundo paso de purificación no fue posible obtener proteínas aisladas en las fracciones, tal como puede apreciarse en la falta de resolución del cromatograma resultante (Fig. 10-2a). El fraccionamiento obtenido de la filtración en gel (F0-FV) se analizó por SDS-PAGE (Fig. 10.2b). Tal como era

de esperar, no fue posible determinar en cuál de las fracciones se encontraba enriquecida LCAT pues todas las fracciones presentaron proteínas contaminantes.

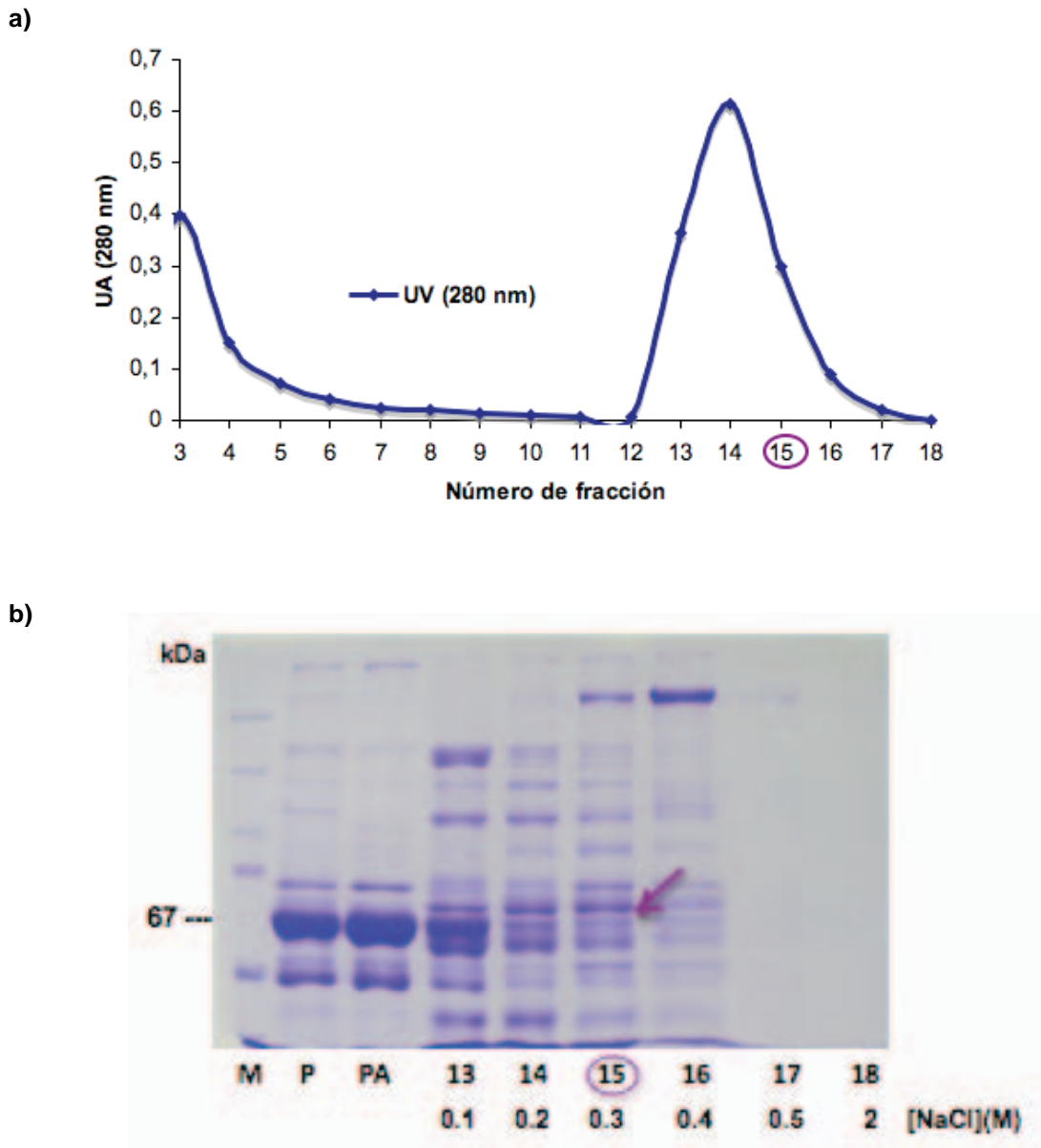
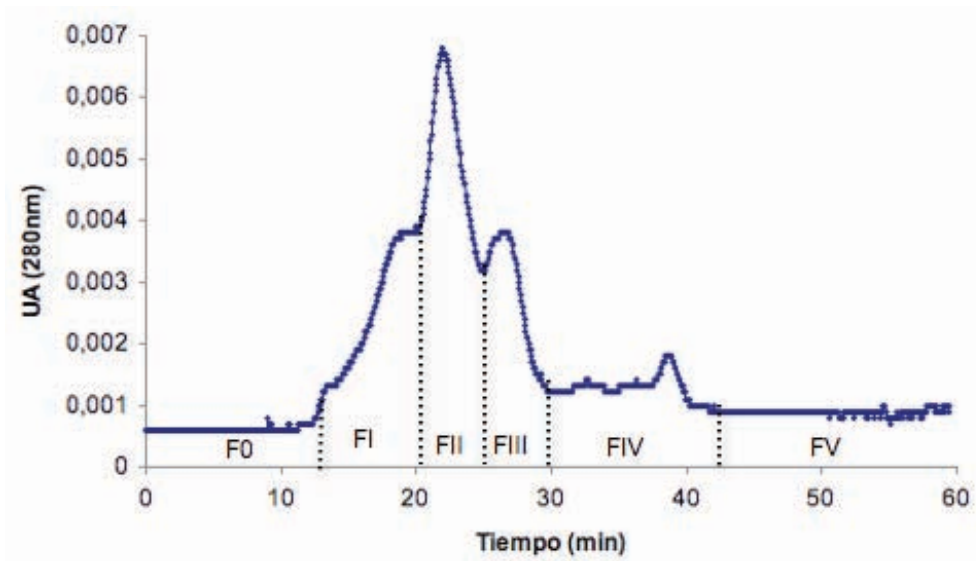


Fig. 10-1. Intercambio aniónico como primer paso de purificación de LCAT de acuerdo con Holmquist, 2002. a) Perfil de elución para la extracción de LCAT con Q-Sepharose Fast Flow. Fracciones 3-12= proteínas de unión inespecífica a la matriz eluidas con el buffer de elución *N*-metilpiperazina 20 mM, pH 5; fracciones 13-18= proteínas eluidas con buffer de elución y un gradiente de NaCl (0.1-0.5 M). b) SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 8% teñido con azul de Coomassie de las fracciones eluidas con buffer salino. M= marcador de peso molecular (kDa); P= Plasma; PA= Plasma acidificado.

a)



b)

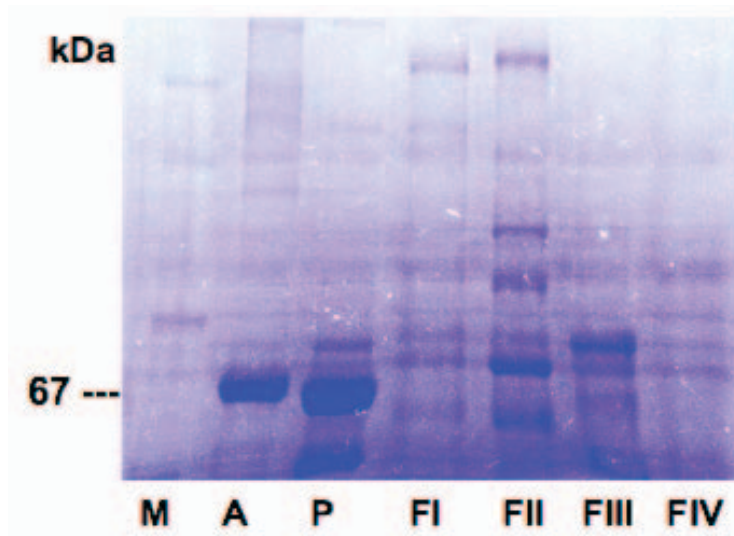


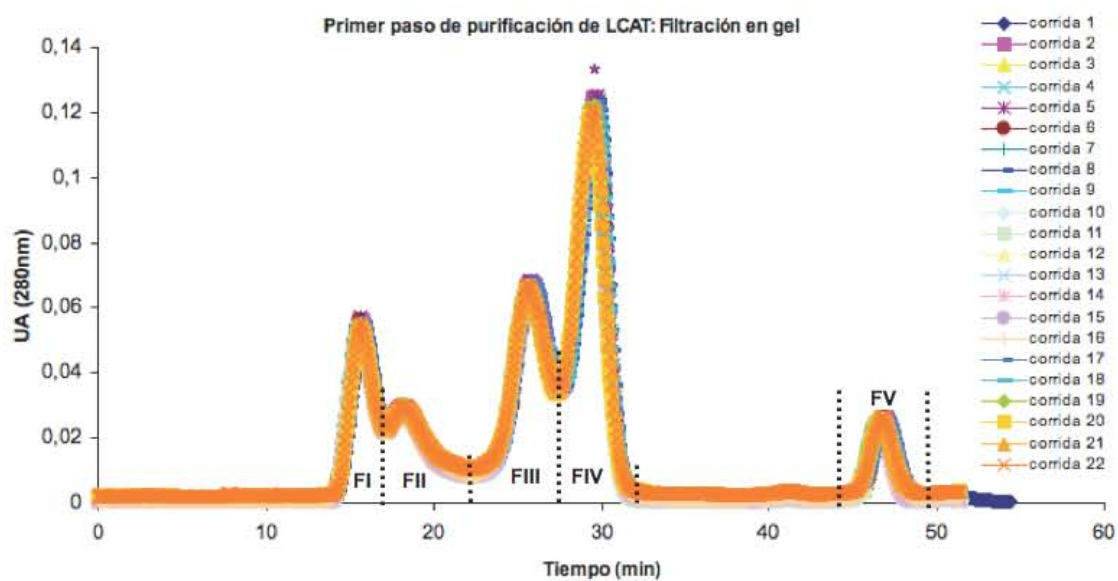
Fig. 10-2. Cromatografía en columna por filtración en gel como segundo paso de purificación de LCAT. a) Cromatograma de la filtración en gel con Superdex 200 10/30 de la fracción 15 proveniente de una cromatografía por intercambio aniónico de plasma humano acidificado. b) SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 8% teñido con azul de Coomassie de las fracciones F1-F4. M= marcador de peso molecular (kDa); A= BSA; P= Plasma; PA= Plasma acidificado; F0-FV= Fracciones de la filtración en gel.

Protocolo 2.

Dado que con el procedimiento anterior no fue posible determinar en qué fracción se encontraba enriquecida LCAT, en este segundo protocolo la muestra de plasma y todos los amortiguadores se ajustaron a pH 7.4 para asegurar que toda la LCAT presente se encontrara en su forma básica. Como segunda modificación, se invirtieron los pasos del primer procedimiento, sometiendo la muestra a una cromatografía en columna por filtración en gel como primer paso de purificación. De esta separación se obtuvieron cinco fracciones (FI-FV) (Fig. 10-3a) que posteriormente se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 10-3b). La banda de 67 kDa (correspondiente al control BSA y al peso molecular aproximado de LCAT) mostró un mayor enriquecimiento en la FIV. Dado que bajo estas condiciones tanto la LCAT como la HSA migrarían juntas y no podrían diferenciarse considerando sólo su peso molecular (PM), se hicieron experimentos de tinción de azúcares con fucsina para distinguir cuál de las fracciones enriquecidas en la banda de 67 kDa presentaba mayor abundancia de proteínas glicosiladas. La FIV fue la que presentó una mayor abundancia de proteínas glicosiladas con peso molecular de 67 kDa.

Como segundo paso de purificación, la FIV se sometió a un intercambio aniónico en columna. Diversos métodos fueron probados para optimizar esta separación hasta que se obtuvo un cromatograma (Fig. 10-4a) del cual tres fracciones (FI-FIII) fueron identificadas, separadas y sometidas a un ensayo de SDS-PAGE (Fig. 10-4b). Debido a la similitud en los valores de pI y PM de la LCAT y la HSA, en este paso de purificación se esperaba comigraran ambas proteínas para tener una fracción rica en LCAT y HSA. La FIII fue la que presentó un mayor enriquecimiento de la banda de 67 kDa y que fue sometida a un tercer paso de purificación en el que se buscó separar la albúmina para finalmente obtener una fracción enriquecida con LCAT.

a)



b)

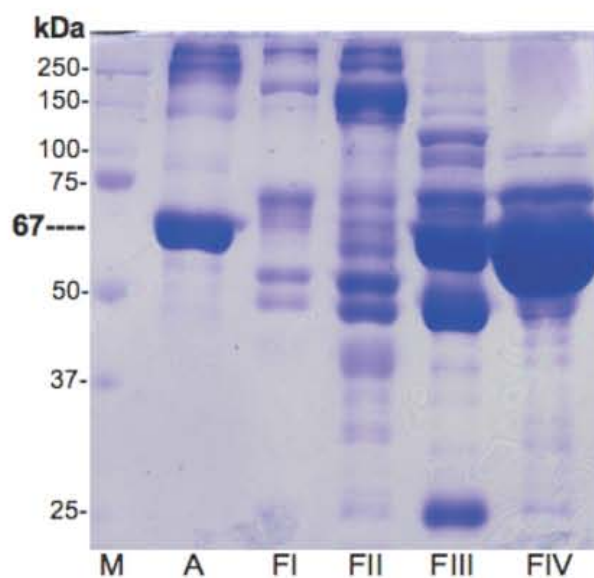
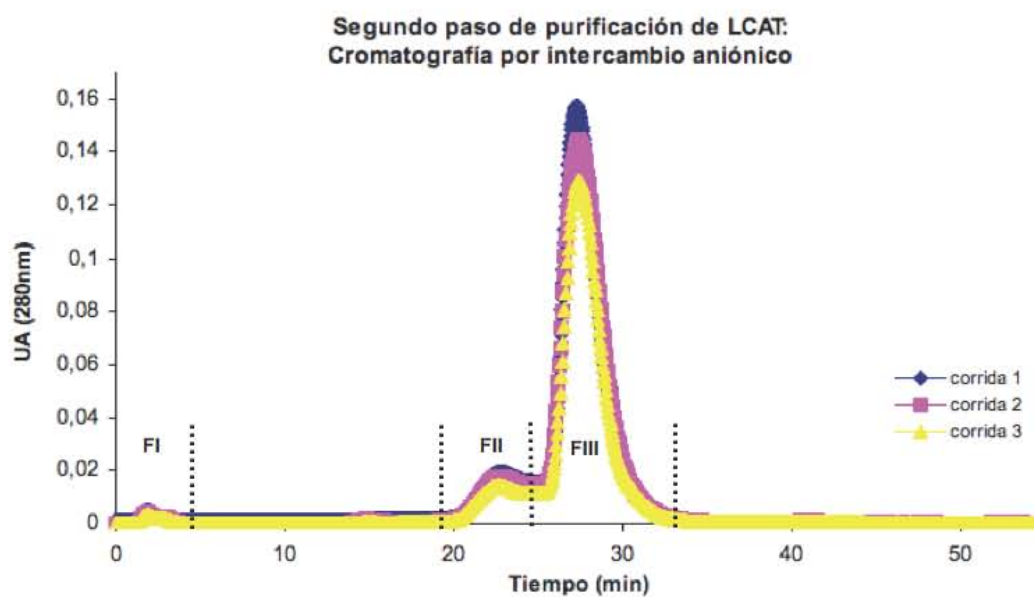


Fig. 10-3. Fraccionamiento de una muestra de plasma humano por cromatografía de filtración en gel como primer paso de purificación. a) Cromatogramas que muestran las fracciones FI-FIV obtenidas en este paso y b) análisis de cada una de éstas en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie después de un ensayo SDS-PAGE. M= marcador de peso molecular (kDa); A= BSA; FI-FIV fracciones de la filtración en gel.

a)



b)

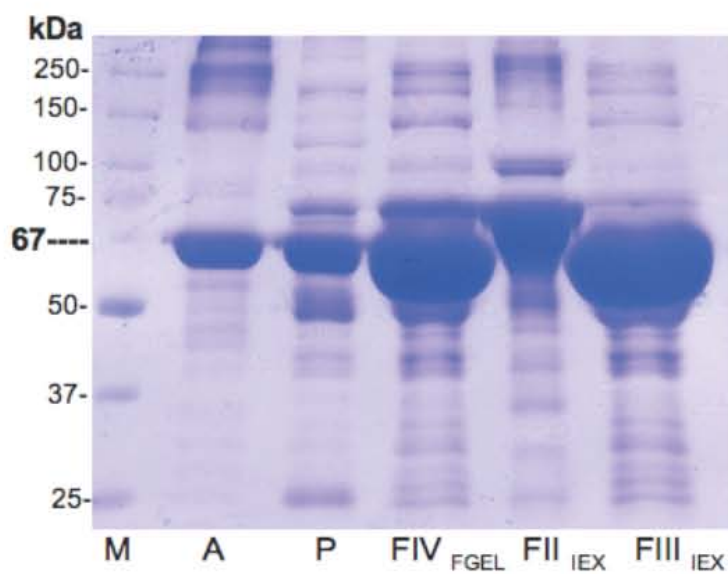
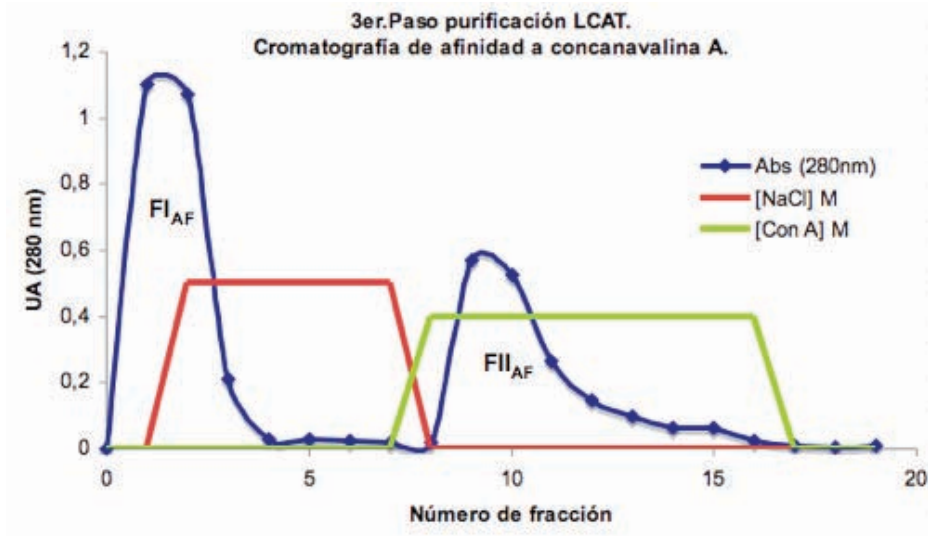


Fig. 10-4. Cromatografía de intercambio aniónico como segundo paso de purificación de LCAT a partir de plasma humano. a) Cromatogramas que muestran las fracciones FI-FIII obtenidas en este paso y b) análisis de la FI y FII en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie por SDS-PAGE. M= marcador de peso molecular (kDa); A= BSA P: Plasma; FIV_{FGEL} fracción IV de la filtración en gel; FII_{IEX}-FIII_{IEX}: fracciones del intercambio aniónico.

Para el tercer paso de purificación se consideró una de las diferencias más significativas entre la albúmina y la LCAT que es el alto grado de glicosilación que ésta tiene con respecto a la primera. Así, la FIII del segundo paso de purificación se sometió a una cromatografía de afinidad a Concanavalina A (Con A), en la que sólo proteínas con ciertos tipos de glicosilaciones (como las que presenta LCAT) se unirían de manera específica a esta resina. La proteína unida inespecíficamente se eluyó con buffer Tris 20 mM, pH 7.4 en presencia de 0.5 M de NaCl, mientras que para la que se unió de manera específica se utilizó Metil- α -D-manopiranosido 0.4 M en buffer de equilibrio Tris 20 mM, pH 7.4. Las dos fracciones obtenidas (Fig. 10-5a) junto con sus correspondientes tratamientos de deglicosilación, se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 10-5b). La fracción obtenida de la unión específica a Con A (FII_{AF}), mostró bastantes proteínas contaminantes fuera de la región de 69 kDa. De la fracción de unión específica sometida a tratamiento de deglicosilación (FII_{AF}) tampoco fue posible obtener la banda esperada de 48 kDa correspondiente a LCAT deglicosilada. Una vez identificadas y separadas las bandas deglicosiladas (Fig. 10-5b, 1-4), éstas fueron analizadas por espectrometría de masas acoplada a MALDI-TOFF con la finalidad de identificar alguna de ellas como LCAT, sin embargo, ninguna de ellas fue identificada como tal.

A partir del análisis de estos resultados, fue necesario diseñar un nuevo procedimiento que considerara las posibles fuentes de pérdida de LCAT durante el proceso de purificación. Dos aspectos importantes que se consideraron determinantes para optimizar el proceso fueron el aumento en el volumen de plasma de partida y la optimización de técnicas más sensibles de identificación de LCAT.

a)



b)

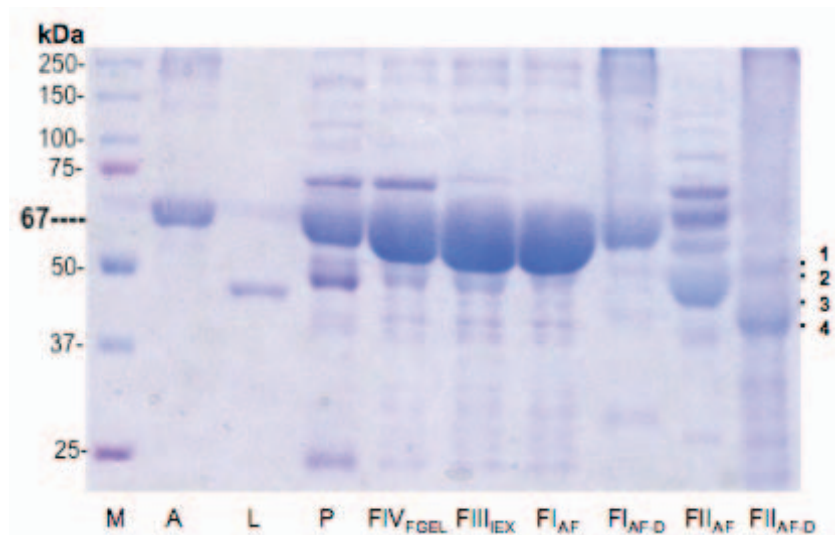


Fig. 10-5. Cromatografía de afinidad a Concanavalina A como tercer paso de purificación de LCAT a partir de plasma humano. a) Perfil de elución de la proteína unida de manera específica a Con A. b) Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie después de un SDS-PAGE que muestra un resumen del proceso de purificación. M= marcador de peso molecular (kDa); A= BSA; L= LCAT recombinante (48kDa); P= Plasma; FIV_{FGEL}= fracción IV de la filtración en gel; FIII_{IEX}= fracción III del intercambio aniónico. FI_{AF}= fracción de proteína no unida a Con A; FII_{AF}= fracción de proteínas glicosiladas unidas a la matriz; FI y FII_{AF-D}: fracciones I y II deglicosiladas. **1 y 2: a-1-antitripsina; 3: a-1-antitripsina y antitrombina; 4: Hemotexina.**